

Aus dem Medizinischen Zentrum für operative Medizin
Klinik für Allgemeinchirurgie
Der Philippsuniversität Marburg
Leiter: Professor M. Rothmund

**Perfluorocarbon (FC 43),
eine Option zur Verbesserung der Funktion von
mikroenkapsulierten
Nebenschilddrüsentransplantaten**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin**

Fachbereich Humanmedizin
Der Philippsuniversität Marburg
Vorgelegt von
Julia Hanz

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
Der Philippsuniversität Marburg am 14.07.2005
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: PD. Dr. Chr. Hasse
Correferent: Prof. Dr. Kroh

Inhaltsverzeichnis

1. Zielstellung	4
2. Einleitung.....	5
3. Material und Methoden	11
3.1. Alginate und FC43	11
3.2. Versuchsvorbereitungen und Gewebekultur	13
3.3. Mikroenkapsulierung.....	16
3.4. Studiengruppen	18
3.4.1. Erste Versuchsreihe (kryokonserviertes Gewebe):.....	19
3.4.2. Zweite Versuchsreihe (kryokonserviertes Gewebe):.....	20
3.4.3. Dritte Versuchsreihe (frisches Gewebe, anderer Spender):	20
3.5. Analytische Verfahren.....	21
3.5.1. Radioimmunoassay	21
3.5.2. Stabilitätstests:.....	22
3.5.3. Histologische Analysen.....	23
3.6. Auswertung und Statistik	24
4. Ergebnisse.....	26
4.1. Erste Versuchsreihe:	26
4.2. Zweite Versuchsreihe	34
4.3. Dritte Versuchsreihe	41
5. Diskussion.....	49
6. Zusammenfassung	55
7. Anhang.....	58
8. Abbildungsverzeichnis.....	60
9. Tabellenverzeichnis	63
10. Literatur	64

1. Zielstellung

Am häufigsten entsteht der permanente, symptomatische Hypoparathyreoidismus postoperativ nach subtotalen Schilddrüsenresektionen oder Thyreoidektomien (Demeester-Mirkine et al., 1992). Der Bedarf nach kausaler Therapie, der allogene Transplantation der Parathyreoidea ohne Immunsuppression, gilt aufgrund der trotz der medikamentösen Therapie einsetzenden Spätfolgen der Erkrankung als unbestritten.

Unter Nutzung der Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe mit Alginat gelangen bereits die ersten klinischen Transplantationen von Patienten mit permanentem Hypoparathyreoidismus (Hasse et al., 1997). Aufgrund eines Integritätsverlustes der Mikro kapseln kam es drei Monate post transplantationem zu einem vollständigen Ausfall der Transplantatfunktion. Eine ausreichende Langzeitstabilität der Mikro kapseln bei suffizienter nutritiver Versorgung des enkapsulierten Gewebes ist für die Transplantation von entscheidender Bedeutung. Erste in vitro Versuche zur Inselzelltransplantation hatten gezeigt, dass Perfluorokarbon FC43 die Sauerstoffdiffusionsfähigkeit von Alginatkapseln erhöhen kann (Inverardi et al., 1999) In der vorliegenden Studie wurde dies auf Reproduzierbarkeit für Nebenschilddrüsengewebe getestet. Folgende Fragestellungen wurden in der Studie bearbeitet:

1. Ist Perfluorokarbon zur Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe überhaupt geeignet?
2. Wie beeinflusst Perfluorokarbon die Sauerstoffversorgung von enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe?
3. Gibt es ein optimales Konzentrationsverhältnis für Gewebetransplantate in vitro?
4. Wie verhalten sich Stabilität und Funktion von Mikro kapseln mit Perfluorokarbonzusatz in vitro?

2. Einleitung

Der Hypoparathyreodismus entsteht meist postoperativ nach subtotaler Schilddrüsenresektion (Demesteeer-Mirkine et al., 1992; Harris, 1992) oder Thyreoidektomie (Salvesen et al., 1991; Wax und Briant, 1992). Allein in Deutschland kommt es so zu circa 2.000 Neuerkrankungen pro Jahr, wenn man eine Inzidenz von 1% für subtotale Schilddrüsenresektionen und 10% für Thyreoidektomien (Ziegler, 1979; Gann und Paone, 1976) und die Gesamtzahl von etwa 100.000, respektive 1.000 operierten Patienten zugrunde legt (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 1998). Während der Operation können die Nebenschilddrüsen akzidentiell entfernt worden sein oder nur eine Ischämie vorliegen, da die Blutversorgung in der Regel nur über ein einziges Gefäß erfolgt. Primäre Symptome können sich vor allem am ersten oder zweiten postoperativen Tag manifestierende Tetanien sein.

Außerdem kommt eine autoimmune Form des Hypoparathyreoidismus vor. Sie ist gekennzeichnet durch Candidiasis, gefolgt von Hypoparathyreoidismus, perniziöser Anämie, Hashimoto-Thyreoiditis, frühzeitiger Ovarialinsuffizienz und Diabetes mellitus Typ 1 (Neufeld et al., 1981). Als sehr seltene Formen tritt das Di-George-Syndrom bei Agenesie der Nebenschilddrüsen mit zusätzlicher Aplasie des Thymus und Fehlbildung des Herzens auf. Auch bei unreifen Neugeborenen, Speicherkrankheiten wie Amyloidose und Hämochromatose und Tumorinfiltration der Halsorgane kann es zu einer endokrinen Insuffizienz der Parathyreoideae kommen.

Bei dem Krankheitsbild des Hypoparathyreoidismus entwickelt sich eine Hypokalzämie in Verbindung mit einer Hyperphosphatämie durch eine Verminderung der Kalziumfreisetzung aus dem Knochen und der erniedrigten renalen und intestinalen Resorption von Kalzium, wobei der phosphaturische Effekt ebenfalls wegfällt. Die Symptome sind durch das tetanische Syndrom und die Folgen der Organverkalkungen geprägt. Das tetanische Syndrom basiert auf der gesteigerten neuromuskulären Erregbarkeit infolge der Verminderung des ionisierten Kalziums. Beim Vollbild des tetanischen Anfalles kommt es nach Vorzeichen wie Parästhesien um den Mund und an Händen und Armen zu Verkrampfungen der Muskulatur in typischer Ausprägung: die Daumen werden in sogenannter Geburtshelfer- oder Pfötchenstellung in die

Hohlhand eingezogen und der Mund wird im perioralen Krampf zum sogenannten „Karpfenmaul“ verzogen. Verkrampfungen der intestinalen Muskulatur können als Bauchschmerzen mit Durchfällen und vermehrtem Harndrang imponieren. Weitere Symptome können individuell unterschiedlich ausgeprägt auftreten. Bei diesen Anfällen bleibt das Bewusstsein erhalten. Etwa ein Viertel der erkrankten Patienten bleibt von den tetanischen Anfällen verschont. Die ausgeprägteste Organmanifestation des unbehandelten Hypoparathyreoidismus ist die tetanische Katarakt, eine paradoxe Verkalkung der Augenlinse, wahrscheinlich durch die schwankenden Phosphatspiegel verursacht. Paradox bedeutet hier, dass es zu einer Organverkalkung trotz des erniedrigten Kalziumspiegels kommt. Es treten noch weitere paradoxe Organverkalkungen auf, so z.B. der Morbus Fahr, der die Basalganglien betrifft. Im Kindesalter kann die Erkrankung Zahnentwicklungsstörungen und Minderwuchs verursachen (Ziegler; 1999).

Ziel der Langzeittherapie des Hypoparathyreoidismus ist die Beschwerdefreiheit des Patienten. Bei der medikamentösen Therapie muß der Serumkalziumspiegel daher nicht vollständig normalisiert werden, sondern kann im unteren Normbereich liegen. Dieses therapeutische Ziel kann oft schon mit Kalziumpräparaten erreicht werden. Problematisch können dabei allerdings die durch ggf. hohe Dosen verursachten gastrointestinalen Nebenwirkungen werden, die beim Überschreiten einer Dosis von 2-3g/d von den meisten Patienten nicht mehr toleriert werden. Die Kalziumsalze werden als Glukonat, Ziträt, Laktat, Chlorid und Karbonatsalz angeboten und unterscheiden sich in ihrem Gehalt an elementarem Kalzium. Meist muss zusätzlich ein Vitamin D Präparat gegeben werden. Die Dosis muss dabei jedem Patienten individuell angepasst werden (Okano et al., 1982), damit es nicht zu einem Hyperkalzämiesyndrom kommt. Diese Hyperkalzämien können auch nach jahrelanger konstanter Therapie auftreten und erfordern eine engmaschige Kontrolle des Kalzium- und Phosphatspiegels.

Hinweisende Symptome auf ein Hyperkalzämiesyndrom können Polyurie und Polydipsie, Appetitlosigkeit, Übelkeit bis zum Erbrechen, Adynamie, Reflexabschwächung und Zeichen des endokrinen Psychosyndroms sein. Bei unzureichender Therapie können Organkalzifizierungen,

Nierenfunktionsstörungen bis zu Anurie, Koma und schließlich der Tod durch Intoxikation auftreten.

Diese ständige potentielle Nebenwirkung der medikamentösen Therapie erfordert als Alternative die Suche nach einer suffizienteren, nebenwirkungsärmeren und womöglich kausalen Therapieoption. Es steht außer Frage, dass die medikamentöse Therapie mit Kalzium und Vitamin D nie eine so feinabgestimmte Anpassung an Stoffwechselprozesse und einen kompletten Ersatz der komplexen Stoffwechselfunktionen des PTH leisten kann. Eine alternative Behandlungsmöglichkeit stellt die allogene Transplantation der Parathyreoidea dar. Dabei lassen sich zwei Forschungsansätze differenzieren. So könnte man durch die Wahl eines geeigneten Transplantationsortes an einer Stelle des Körpers, der eine immunologische Sonderstellung zukommt, wie z.B. das Ventrikelsystem des Gehirns, eine ausreichende Funktion des Transplantates bei verzögerter Immunantwort bewirken (Yao et al., 1993).

Ein anderer Ansatz verfolgt eine mögliche Reduzierung der Immunogenität des Gewebes (Raaf et al., 1977; Starling et al., 1997; Gough, Finnimore 1979, 1980). Dabei zeigt sich aber, dass weder verschiedenste Verfahren der Gewebekultur, noch die Reduzierung von MHC-Antigenen der Klasse 1 und 2 im Gewebe zu einem längeranhaltenden Transplantatüberleben führen (Kukreja et al., 1979; Naji et al., 1979; Sollinger et al., 1983; Hasse et al., 1991).

Allerdings ist der Hypoparathyreoidismus nur selten lebensbedrohlich, so dass eine systemische Immunsuppression post transplantationem nicht gerechtfertigt erscheint. Ohne diese bleibt die allogene Transplantation der Parathyreoidea bisher jedoch erfolglos. Aus den Studien zur Inselzelltransplantation wurde deshalb von unserer Forschergruppe in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg die Technik der Immunisolation modifiziert und weiterentwickelt, bei der das zu transplantierende Gewebe mit einer semipermeablen Membran, bestehend aus dem Naturstoff Alginat, umhüllt wird – die Mikroenkapsulierung.

Als Alginat bezeichnet man eine Gruppe von sauren Polysacchariden, die aus linearen Polymeren von Mannuron- und Guluronsäuren bestehen. Dabei wechseln sich Homopolymersequenzen (M-Blöcke, G-Blöcke) mit

alternierenden Sequenzen (MG-Blöcke) ab. Die ausschlaggebende Eigenschaft der Alginat, die ihre vielseitige Verwendbarkeit in der Lebensmittelindustrie, der Chemie, der Biotechnologie und der Medizin ermöglicht, ist die Fähigkeit zur ionotropen Gelbildung.

Alginatmikrokapseln sollten dabei neben einer ausreichenden Biokompatibilität und einer mechanischen und chemischen Stabilität eine definierte molekulare Ausschlussgrenze für Komponenten des Immunsystems aufweisen um eine effektive Immunisolierung zu gewährleisten. Die molekulare Ausschlussgrenze der Kapseln müsste so modifizierbar sein, dass niedermolekulare Substanzen wie nutritive Faktoren und Hormone (als Produkt) leicht durch die Kapselmembran diffundieren können, während höhermolekulare Antikörper und immunologische Zellen (Makrophagen, T-Lymphozyten, Killerzellen) abgehalten werden.

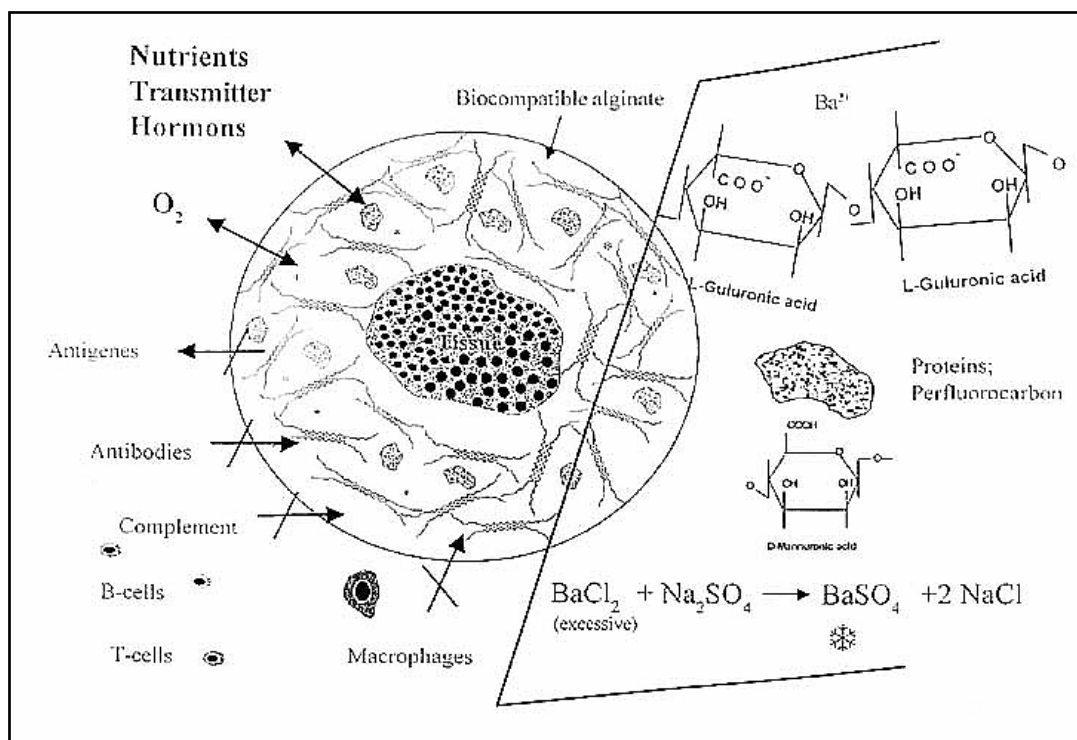


Abbildung 1: Funktionsprinzip der Alginatkapsel

In Kombination mit einer speziellen Gewebekulturpassage wurden bereits vor Jahren in Tierversuchen Erfolge bei der Iso-, Allo- und Xenotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe ohne Immunsuppression mit einem kommerziell verfügbaren Alginat erzielt (Hasse et al. 1994(1), Hasse et al.

1994(2)). Allerdings besaß dieses Alginat selbst mitogene Eigenschaften, die zu einer Fremdkörperreaktion führten. Es konnte gezeigt werden, dass es die Freisetzung von TNF- α und Interleukinen stimuliert und zu einer Aktivierung von Makrophagen führt (Hasse et al., 1998). Deshalb wurde das kommerzielle Alginat mittels einer patentierten elektrophoretischen Methode dahingehend aufgereinigt, dass es keine mitogenen Eigenschaften mehr aufweist (Zimmermann et al., 1992; Klöck et al., 1994).

Dieses amitogene Alginat wurde schließlich nach weiterer Austestung (Hasse et al., 1996; 1998) zur Transplantation von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe in die Muskeln des Unterarms auf der nondominanten Seite zweier Patientinnen mit Hypoparathyreoidismus verwendet. Nach der Implantation war bei beiden Patientinnen eine Normokalzämie und PTH-Serumspiegel im Normbereich, bei geringer immunsuppressiver Begleittherapie zu beobachten (Hasse et al., 1997). Nach 3 Monaten trat jedoch ein Transplantatversagen ein, verursacht durch eine Instabilität der Unterkapseln (bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

Die meisten kommerziell verfügbaren Alginat werden aus einer Algenmischung hergestellt und beinhalten verschiedenste Verunreinigungen (Zimmermann et al., 1992). Manche Bestandteile der braunen Algen (Proteine, Polyphenole, Pigmente) beeinflussen die Biokompatibilität (Skjåk-Bræk et al., 1992) und sind nur unvollständig durch aufwendige Verfahren zu entfernen (Klöck et al., 1994; Vos et al., 1997). Dabei fallen nur kleine Mengen an und die Reproduzierbarkeit ist für die Herstellung eines Hüllstoffes für Mikrotransplantate ungenügend. Deshalb wurde die Herstellung des Alginates so modifiziert, dass es direkt aus den frischen Blättern der braunen Alge *Laminaria pallida* hergestellt wird. Diese Methode vereinfacht die Aufreinigung und Verarbeitung und gewährleistet eine bessere Reproduzierbarkeit (Jork et al., 2000). Für diese Studie wurde dieses neue Alginat verwendet.

Schwachstellen im Verfahren der Mikroenkapsulierung zeigen sich bei der nutritiven Versorgung des enkapsulierten Gewebes und der Stabilität der Alginatkapseln. Es kommt zu einer Nekrose des Gewebes in der Kapsel die in den zentralen Gewebeanteilen beginnt und zu äußeren Anteilen fortschreitet.

Dabei nimmt die Menge des sezernierten Parathormones ab. Eine vollständige Nekrose des enkapsulierten Gewebes ist mit dem Transplantatversagen gleichzusetzen. Dies konnte bei sowohl aus in vitro, wie auch aus in vivo stammenden Versuchsgruppen festgestellt (Hasse et al., 1997(1)) werden. Eine der Hauptursachen dafür ist wahrscheinlich eine zu niedrige pO_2 -Konzentration im Gewebekern.

Erste in vitro-Versuche bei der Inselzelltransplantation konnten zeigen, dass Perfluorokarbon die Sauerstoffdiffusionskapazität von Alginatkapseln erhöht und zusätzlich immunsuppressive Effekte auf Makrophagen und Lymphozyten besitzt (Inverardi et al., 1999).

Auch vom Biotechnologischen Institut der Universität Würzburg wurde nachgewiesen, dass Mikrokapseln mit Perfluorokarbonzusatz eine gute Stabilität im Langzeitversuch aufweisen (M. Hillgärtner et al., 1999). Nachteil dieser Studie war allerdings, dass nur leere Mikrokapseln ausgetestet wurden. Bisher existieren keine Daten zum Effekt von Perfluorokarbon auf mikroenkapsulierte Gewebetransplantate der Parathyreoidea.

Perfluorokarbonate werden bereits als intravenöse Kontrastmittel angewendet (Shukla et al., 1996; Thomas et al., 1997). Sie sind hydrophob, chemisch inert, biokompatibel und untoxisch (Lutz et al., 1995). In unseren Versuchen gelangt das kommerziell verfügbare FC 43 (CAS-Nummer 311-89-7) zur Anwendung. Diese Studie diente deshalb erstmalig dazu, die Effekte von Perfluorokarbon auf Nebenschilddrüsengewebetransplantate zu eruieren.

3. Material und Methoden

3.1. Alginat und FC43

Alginat

Alginat bestehen aus sauren Polysacchariden, die in linearen Polymeren von 1,4- verknüpften β -D-Mannuron- und α -L-Guluronsäuren angeordnet sind. Diese Monomere kommen sowohl in homopolymeren Sequenzen als reine Mannuron (M)- oder Guluronblöcke (G), als auch in alternierender Struktur mit wechselnden MG-Monomeren vor. Das Verhältnis der Homopolymer- zu den Heteropolymerblöcken ist von der Pflanzenspezies, Herkunft, Alter und morphologischem Bereich der Algen abhängig. Die entscheidende Eigenschaft der Alginat für ihren Einsatz zur Immobilisierung von Zellen ist ihre Fähigkeit zur ionotropen Gelbildung. Dabei erfolgt die Gelbildung durch Quervernetzung mit multivalenten Kationen (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+}) oder Polykationen, wie Polylysin, aus wässrigen Alginatlösungen. Nach dem „egg-box-model“ von Grant (1973) bildet nur die Guluronsäure Wechselwirkungen mit den Kationen aus. Dabei ordnen sich zwei Guluronsäureketten so an, dass zwischen ihnen durch ihre geknickte Form Hohlräume entstehen, die Kationen aufnehmen können. Die Kationen binden dabei an Carboxylgruppen der Guluronsäure (Smidsrød, 1990).

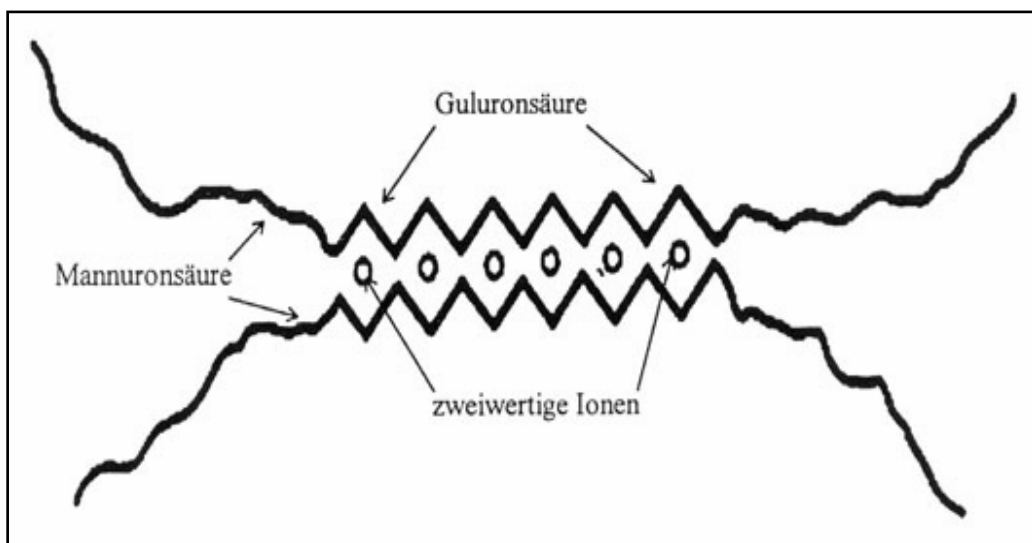


Abbildung 2: Das „egg-box-model“ nach Grant

Zur Transplantation werden meist Ca^{2+} - und seit einigen Jahren auch Ba^{2+} -Alginat eingesetzt. Barium scheint für die Mikroenkapsulierung vorteilhafter zu sein. Als problematisch ist die Wirkung von überschüssigen Bariumionen nach der Vernetzung zu sehen. Diese sind in Konzentrationen von 5-10mM potente Inhibitoren von Kaliumkanälen in Biomembranen und müssen daher möglichst schnell entfernt werden (Zimmermann et al., 2000).

Das für diese Studie verwendete Alginat wird aus frischen Braunalgen der Gattung *Laminaria pallida* im Biotechnologischen Institut am Hubland in Würzburg hergestellt. Dazu wird von den Blättern eine äußere Schicht entfernt, so dass das Alginat nur aus dem inneren Blatt extrahiert wird. In verschiedenen Schritten wird das Alginat dann gereinigt und so aufbereitet, dass Verunreinigungen eliminiert werden und das Endprodukt ein amitogenes, steriles Gel ist (Jork et al., 2000). Dabei beträgt die Ausbeute der ursprünglichen Trockenmasse nur etwa 10-15%.

Das Alginat weist ein Mannuron-Guluronsäureverhältnis von 70:30, einen geringen Bestand an Polyphenolen und einen Proteingehalt unter der Nachweisgrenze auf.

Die Viskosität liegt für eine 0,1%-Lösung bei 12mPa/s und für eine 0,5%-Lösung bei 281mPa/s. Das Molekulargewicht liegt über 250 kDa.

Heptacosaperfluorotributylamine (FC 43)

FC 43 oder Heptacosaperfluorotributylamine hat die Formel $C_{12}F_{27}N$ und ein Molekulargewicht von 671.09 (CAS-Nummer 311-89-7).

Es wurde von der Firma Sigma als Lösung mit einer Konzentration von 25 $\mu\text{L/ml}$ in Essigsäure geliefert (Bestellnummer H5262).

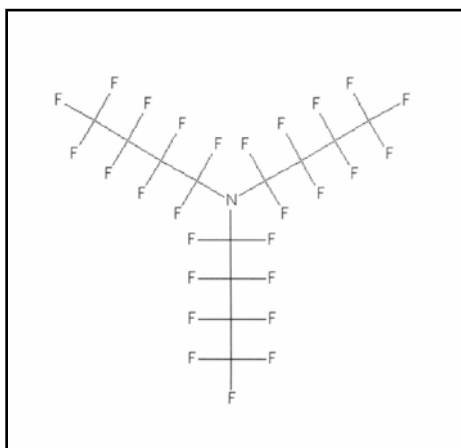


Abbildung 3: Strukturformel des Perfluorotributylamin (FC 43); aus: NIST, ChemistryWebBook, 2000

3.2. Versuchsvorbereitungen und Gewebekultur

Für diese Studie wurde sowohl kryokonserviertes Nebenschilddrüsengewebe, das in einem Stickstofftank verwahrt wird, als auch frisch entnommenes Nebenschilddrüsengewebe verwendet. Das kryokonservierte Gewebe erfordert bei der Vorbereitung zur Mikroenkapsulierung einige zusätzliche Arbeitsschritte.

Kryokonserviertes Gewebe

Für die Versuchsreihe wird kryokonserviertes humanes Nebenschilddrüsengewebe desselben Spenders verwendet. Das Einverständnis des Spenders zur Teilnahme an Studien war vorher von ärztlicher Seite aus eingeholt worden. Vor der Mikroenkapsulierung wird dieses Gewebe durch langsames Hin- und Herbewegen im Wasserbad (37°) aufgetaut.

Das fast vollständig aufgetaute Gewebe wird in eine sterile Petrischale überführt, wobei die Konservierungsflüssigkeit sofort durch eine Waschlösung ersetzt wird.

Dieses Waschmedium wird aus 500ml RPMI 1640 mit L-Glutamin Lösung [Gibco, Germany], 10000µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG, Berlin, Germany) und 20% FCS (Seromed, Germany) hergestellt.

1,5 ml dieses Mediumgemisches werden tropfenweise auf das Gewebe gegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 min. wieder abpipetiert. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt.

Dann wird das Gewebe mit zwei sterilen Skalpellen (Feather, Disposable Scalpel No.22, Produkte für die Medizin AG, Köln) in ca. 2mm³ große Partikel geschnitten.

Nach dem Waschvorgang werden die Partikel in ein steriles Becherglas überführt und 2-3 min. mit steriler NaCl-Lösung (steril-isotone NaCl-Lösung 0,9%, Braun, 500ml, Melsungen) unter zweimaliger Wiederholung nochmals gespült

Der gesamte Wasch- und Schneidevorgang muss unter sterilen Bedingungen unter der mikrobiologischen Sicherheitsbank (NUNC GmbH) und auf Eis erfolgen.

Frisches Gewebe

Das Gewebe war zuvor einem Patienten mit einem sekundärem Hyperparathyreodismus, ebenfalls nach dessen präoperativer Einwilligung zur Teilnahme an der Studie, entnommen und in ein steriles Röhrchen (PP-Röhrchen steril, 50ml, Cellstar®, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit steriler NaCl-Lösung (steril-isotone NaCl-Lösung 0,9%, Braun, 500ml, Melsungen) überführt worden. Unter sofortiger Kühlung auf Eis wurde es unter der mikrobiologischen Sicherheitsbank sofort weiterverarbeitet.

Dafür wird das Gewebe in eine sterile Petrischale überführt und mehrmals mit steriler NaCl-Lösung gespült. Dann wird es mit 2 sterilen Skalpellen ebenfalls in 2mm³ Stücke zerschnitten und wie das kryokonservierte Gewebe im Folgenden weiterverarbeitet (s.o.).

Gewebekulturpassage und Gewebekultur

Nach Bach (1976) sind zur Induktion einer Fremdkörperreaktion und damit einer Transplantatabstoßung zwei unabhängige Signale notwendig. Es wird vermutet, dass diese Signale von MHC1- und MHC2- Antigenen ausgehen.

Lafferty (1980) und Bach (1980) beschreiben Modelle, die die Wichtigkeit dieser Antigenklassen bei der Auslösung der Fremdkörperreaktion darstellen. In Organtransplantaten gibt es nur eine kleine Anzahl von Zellen, die beide Antigenklassen tragen: Lymphozyten, Plasmazellen und dendritische Zellen. Könnten diese Zellen aus dem Transplantat entfernt werden, resultierte eine verminderte Immunogenität der restlichen Zellen. Dieser Effekt kann durch eine der Transplantation vorgeschaltete Gewebekultur erzielt werden (Sollinger et al., 1983).

Die ca. 2mm³ großen Nebenschilddrüsen(NSD)-Gewebeartikel werden einer circa 24-stündigen Gewebekulturpassage in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂ und 37°C in einem Nährmedium inkubiert. Dieses Nährmedium besteht aus 250ml RPMI 1640 mit Glutamin (500ml, Life Technologies), 5ml Penicillin/Streptomycin (SEROMED 10,000U/10,000µg/ml Biochrom KG, Berlin 46), 10% FKS, sowie 4,5 ml Calciumchlorid (147 mg ad 10ml Aqua dest., Apotheke der Philippsuniversität Marburg), was einer CaCl₂-Konzentration von 2,4 mmol/L entspricht.

Die Bedingungen zur Gewebekultur sind genau dieselben wie zur Gewebekulturpassage.

In einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) werden die Mikrokapseln in 24 Konkavitäten (NUNC LON TM-Delta) bei einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂ und 37°C in dem Nährmedium inkubiert.

Aufbereitung des Alginates

Die für diese Studie hergestellten Kapseln bestehen aus einer inneren und einer äußeren Kapsel, die sich in der Alginatkonzentration unterscheiden.

Während die äußere Kapsel zu 0,7% aus Alginat besteht, hat die Innere nur eine Konzentration von 0,65%.

Das 0,7% Alginat wird von dem Lehrstuhl für Biotechnologie, Biozentrum, Am Hubland in Würzburg, bereits gebrauchsfertig geliefert und muss nur noch auf die Konzentration von 0,65% zur Herstellung der inneren Kapsel mit steriler isotoner NaCl-Lösung (BRAUN, 500ml, Melsungen) verdünnt werden.

Dazu wird die benötigte Alginatmenge steril in 2 sterile Zentrifugenröhrchen (50 ml, Greiner Labortechnik, Nürtingen) abgefüllt. Anschließend werden noch

jeweils 10% inaktiviertes fetales Kälberserum (Seromed , Germany) zugesetzt

.

Da das Alginat zur Mikroenkapsulierung absolut blasenfrei sein muss, wird es 20 Minuten bei 2400 Umdrehungen und 4°C in einer Zentrifuge (Minifuge T, Heraeus Holding GMBH, Hanau) zentrifugiert.

3.3. Mikroenkapsulierung

Die Mikroenkapsulierung erfolgt in der von Geisen et al. (1990) entwickelten und modifizierten Methode zur Herstellung der klinischen Allotransplantate.

Unter der sterilen Sicherheitsbank wird ein Metallstativ aufgebaut und mit Hilfe zweier Metall-Klemmen die sterile Dreistoff-Düse (Herstellung der Medizintechnik Würzburg) zur Mikroenkapsulierung eingespannt.

Diese Dreistoff-Düse hat ein bewegliches inneres Hohlrohr (innere Düse,1) mit Lueranschluß (innere Durchmesser: 350µm), ein mittleres Hohlrohr (mittlere Düse,2) mit einem Durchmesser von 1mm und einen äußeren Kanal (3), der in einem justierbaren Luftfokussierkopf mündet .

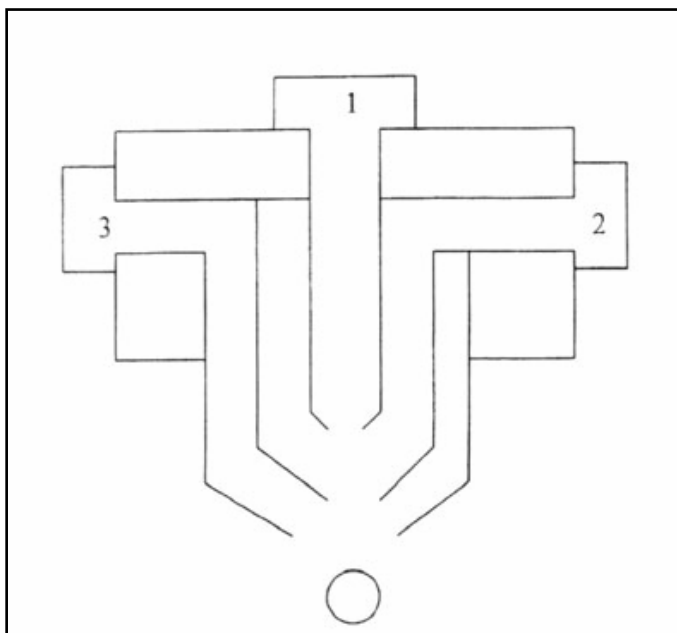


Abbildung 4: Dreistoff- Düse

Diese Elemente sind an einem Düsenkopf montiert, an dem sich Luftdruckanschluss und Lueranschluß befinden. Für die Dosierung der Flüssigkeiten im inneren und mittleren Kanal wurden Dosiersysteme

entwickelt. Sie bestehen aus einem Metallgehäuse mit darin befindlichem Motor, Getriebe und Spindel. Auf der Spindel befindet sich eine Spritzenarretierung, auf der Spritzen von 1ml-50ml Größe aufgesetzt werden können.

Die Steuerung der Motoren erfolgt über Netzgeräte (LPS-301, MI/Meter International Corp., Taipei Hsien, Taiwan) durch Spannungsregelung bei einem festgewählten Stromwert von 0,5 A. Die Zuführung der Luft erfolgt im äußeren Kanal über eine Luftdruckregelung. Die Druckluft wird über ein Ventil im Bereich von 1-10 l/min entnommen. Düsenkopf und Dosierungssysteme sind an einem Stativ befestigt .

Das Alginat-Gewebe-Gemisch wird über den inneren Kanal und das Alginat für die äußere Kapsel über den mittleren Kanal zugeführt. Vor dem Zentrifugieren wird dem Alginat die vorher definierte Menge an FC43 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugesetzt und zwar sowohl dem Alginat für die innere, als auch für die äußere Kapsel.

Das zentrifugierte Alginat wird jetzt durch sterile Pyrogenfilter 0,2µm (Fa.SCHLEICHER & SCHUELLFR 030/3) mehrmals steriltriftriert .

Dazu wird das 0,7% Alginat für die äußere Kapsel in eine sterile 20ml Einmalspritze (BRAUN-Melsungen); das 0,65% Alginat für die innere Kapsel in eine sterile 10ml Einmalspritze (BRAUN-Melsungen) aufgezogen. Das Alginat wird dabei jeweils in einem sterilen 20ml Becherglas aufgefangen und aus diesem erneut aufgezogen .

Intermittierend wird das Alginat dabei auf Eis gekühlt .

Die ca. 2mm³ großen Nebenschilddrüsenpartikel werden aus dem Brutschrank in ihrer Petrischale auf Eis überführt, das Nährmedium wird mit sterilen Einmal-Pipetten (Auslauf) 10ml (GREINER LABORTECHNIK) und dem Pipettus abpipettiert und das Gewebe im Folgenden mehrmals mit einer Sterilen NaCl-Lösung (steril-isotone NaCl-Lösung 0,9%, Braun, 500ml, Melsungen), der vorher 10% FKS zugegeben wird, gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird die gesamte Lösung entfernt. Das Alginat für die innere Kapsel wird in das Becherglas überführt und durch drehende Bewegungen die Verteilung der Partikel so hergestellt, dass die Partikel einzeln frei im Alginat schweben. Dann werden Alginat und darin gelöste Partikel steril in einer 2ml Einmalspritze

(BRAUN Melsungen) aufgezogen und in die Dreistoff-Düse eingespannt. Das Alginat für die äußere Kapsel wird steril in einer 10ml Spritze aufgezogen und ebenfalls in die Düse eingespannt. Die Verkapselung erfolgte nun unter konstantem Druckluftfluss bei circa 6l/min, um eine homogene Kapselgröße zu gewährleisten. Die Kapseln werden dann unter der Düse in einer sterilen Petrischale 94x16 mm (GREINER LABORTECHNIK) in einem Fällbad aufgefangen und in diesem zur Vernetzung 7 min. aufbewahrt.

Dieses Fällbad wird vorher aus 20mmol BaCl (MERCK DARMSTADT, 500g), 5mM Histidin (SIGMA, 25g), 115mmol NaCl (ROTH GmbH+Co., Karlsruhe; 1kg) in 1 Liter Aqua Bidest hergestellt. Mit Natronlauge (MERCK, Darmstadt) 1mol/l wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird steril filtriert und mit 10% FKS (Seromed) Germany versetzt. Nach 7 Minuten wird das Fällbad durch eine Waschlösung ersetzt.

Diese Waschlösung besteht aus isotoner Kochsalzlösung (BRAUN, 500ml, Melsungen) und 10% FKS. Die Kapseln verbleiben darin 2-5 min., dann wird die Lösung abpipetiert und der Waschvorgang insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wird die Waschlösung vollständig aus der Petrischale entfernt und durch eine Natriumsulfat-Waschlösung ersetzt. Zur Herstellung dieser Lösung werden 6mM Natriumsulfat(MERCK, Darmstadt, 1kg) in 1l Aqua-bidest aufgelöst und mit 10 % FKS versetzt. Die Kapseln werden darin 20 min inkubiert. Nach der Inkubation werden sie vorsichtig mit einem sterilen scharfen Löffel (Fa. Aesculap) entnommen und in eine sterile Konkavitätplatte mit 24 Konkavitäten (NUNCCLON TM-Delta) überführt und zwar pro Konkavität je 2 Kapseln. Die Löcher der Platte werden vorher mit je 1500µl des Nährmediums zur Inkubation befüllt .

In diesem Medium werden die Kapseln im Brutschrank (Heraeus) unter den oben bereits geschilderten Bedingungen inkubiert .

3.4. Studiengruppen

Für diese Studie werden humanes kryokonserviertes Nebenschilddrüsengewebe und „frisches“ Gewebe von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreodismus verwendet. Dabei bedeutet „frisch“, dass das Gewebe direkt nach der Entnahme (Operation des Patienten) ohne Kryokonservierung mikroenkapsuliert wird. Gewebekultur und

Mikroenkapsulierung werden exakt mit den Materialien und Methoden durchgeführt, wie von Hillgärtner (1999) und von Jork (2000), beschrieben. Das Gewebe wird dazu in insgesamt 9 Versuchsgruppen in jeweils 48, ca. 2mm³ große Partikel zugeschnitten und weiterverarbeitet. Insgesamt sind die 9 Versuchsgruppen auf 3 aufeinanderfolgende Versuchsreihen verteilt.

3.4.1. Erste Versuchsreihe (kryokonserviertes Gewebe):

Ermittlung des optimalen Konzentrationsverhältnisses:

Die erste Versuchsreihe dient der Bestimmung des optimalen Konzentrationsverhältnisses von FC43 als Alginatzusatz. Sie besteht aus den Testgruppen, einer Vergleichsgruppe und einer Kontrollgruppe, die zur Strukturierung alphabetisiert werden (a-d).

Das Alginat der Testgruppen 1 enthält FC43 in unterschiedlichen Konzentrationen:

- a) 0,01% FC43
- b) 0,1% FC43
- c) 1% FC43
- d) 10% FC43

Die Vergleichsgruppe 1 besteht aus mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zugabe von FC 43 zum Alginat. Die Kontrollgruppe besteht aus nativem, d.h. unverkapseltem humanen Nebenschilddrüsengewebe. Sie beweist im Vergleich zu Vergleichs- und Testgruppen, dass natives Gewebe dem mikroenkapsulierten Gewebe bezüglich Vitalität, Stabilität und endokriner Funktion unterlegen ist. Der Übersichtlichkeit wegen wird nur die Kontrollgruppe, die mit der 2. Versuchsreihe geführt wird statistisch ausgewertet. Alle Gruppen werden mit kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe desselben Spenders angelegt. Testgruppen, Vergleichs- und Kontrollgruppe werden für insgesamt 22 Tage genau denselben Kulturbedingungen unterzogen. In für jede einzelne Versuchsgruppe genau gleichen Abständen (Tag 0,3,5,8,15,22) werden Proben zur Parathormonbestimmung (mittels Radioimmunoassay) gewonnen und jeweils 2 Kapseln bzw. Partikel zur histologischen Aufarbeitung entnommen. Die Durchmesser aller Mikrokapseln werden regelmäßig im

Abstand von mindestens 3 Tagen gemessen und die Kapseln dabei einer genauen mikroskopischen Analyse auf Oberflächendefekte unterzogen.

3.4.2. Zweite Versuchsreihe (kryokonserviertes Gewebe):

Langzeitversuch in vitro:

Es werden eine Testgruppe 2, die FC43 in einer Konzentration von 0,1% enthält und eine Vergleichsgruppe 2 (ohne FC43) angelegt. Diese Konzentration ist dem Ergebnis der 1. Versuchsreihe nach als optimal anzusehen (Testgruppe 1b mit 0,1% FC43). In der 2. Versuchsreihe wird auch eine Kontrollgruppe mit nativem Gewebe mitgeführt. Die 2. Versuchsreihe dient der Bestätigung und Verdeutlichung der Unterschiede zwischen Testgruppe 2 und Vergleichsgruppe 2 im Langzeitvergleich. Dazu wird der Versuchszeitraum auf 60 Tage ausgedehnt. Materialien und Methoden gleichen exakt der 1. Versuchsreihe, es wird auch kryokonserviertes Gewebe desselben Patienten verwendet.

3.4.3. Dritte Versuchsreihe (frisches Gewebe, anderer Spender):

Es werden eine Testgruppe 3 (0,1% FC43) und eine Vergleichsgruppe 3 ohne FC43 angelegt.

Der Unterschied zur 2. Versuchsreihe besteht darin, dass das verwendete Nebenschilddrüsengewebe einem Patienten frisch entnommen wird und vor der Mikroenkapsulierung nicht kryokonserviert wird. Die Versuchsreihe dient der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf Gewebe eines anderen Spenders und unter einer modifizierten Versuchbedingung (frisches Gewebe).

Alle drei Versuchsreihen werden Analysen in gleichen Zeitintervallen unterzogen zur Beurteilung:

- des *Sekretionsverhaltens* des Nebenschilddrüsengewebes durch Bestimmung der Parathormonkonzentration durch Radioimmunoassay
- der *Kapselintegrität* und des *Quellverhaltens* durch genaue mikroskopische Begutachtung als Parameter der Stabilität der Mikrokapself

- der *Nekroserate* durch histologische Aufarbeitung und Beurteilung durch einen unabhängigen Gutachter des Institutes für Pathologie der Universität Marburg als Parameter der Vitalität des Gewebes

Die Zuteilung der Gewebepartikel zu den Versuchsgruppen und die Entnahme der Kapseln zur histologischen Aufarbeitung erfolgten randomisiert.

3.5. Analytische Verfahren

3.5.1. Radioimmunoassay

Zur Gewinnung der Proben für den Radioimmunoassay wird das Inkubationsmedium abpipetiert und ersetzt (1500µl/Konkavität). In diesem werden die Kapseln für genau zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Proben wiederum steril entnommen und durch neues Inkubationsmedium ersetzt.

Die Proben werden in kleinen Gefäßen (Micro Test Tubes 1,5ml; Eppendorf, Hamburg) bis zur radioimmunologischen PTH-Bestimmung in einem Kühlschrank bei -8°C aufbewahrt. Proben werden bei jeder Reihe und in jeder der Versuchsgruppen an den Tagen 0, 3, 5, 8, und 15 entnommen. Bei den Versuchsgruppen, die über insgesamt 8 Wochen kultiviert werden (Reihe 2 und 3) erfolgte die Probenentnahme nach dem 15. Tag nur noch wöchentlich, d.h. am Tag 22, 29, 36, 43, 50 und 57.

Der verwendete RIA (DSL, Sinsheim, Germany) beruht auf einer „Sandwichmethode“. Der Antikörper gegen humanes Parathormon (iPTH) liegt an die Röhrchenwand gebunden als Festphase vor. In diese Röhrchen wird das zu bestimmende Serum bzw. Nährmedium als Probe hinzugefügt. Das Antigen, iPTH, bildet mit den Antikörpern der Festphase einen Ak-Ag- Komplex aus. Die Antikörper der Festphase liegen im Überschuss vor, so dass alles in der Probe befindliche Antigen (iPTH) gebunden werden kann. In die Röhrchen wird dann ein radioaktiv markierter zweiter Antikörper (Ak*) gegen iPTH gegeben, der sich mit dem Ak-Ag-Komplex zu einem Ak-Ag-Ak*-Sandwich verbindet, der fest an die Röhrchenwand gebunden vorliegt. Alle überschüssigen Ak* und der Rest der flüssigen Probe werden Anschließend

dekantiert und mehrmals mit einer Pufferlösung ausgewaschen, so dass im Röhrchen nur der Sandwich-Komplex zurückbleibt.

Die leeren Röhrchen werden anschließend im ^{125}J -Kanal eines Gammacounters gemessen.

Zur Auswertung der Proben wird anhand genau definierter Standard-Ag-Konzentrationen eine Eichkurve erstellt. Gemessen wird dabei das radioaktive Signal des zweiten Antikörper Ak*. Je höher die Konzentration des Antigen in der Probe ist, umso intensiver fällt auch das Signal des proportional dazu gebundenen Zweitantikörpers Ak* aus.

Zur Durchführung müssen zuerst die Proben, die zur Erstellung einer Standardkurve benutzt werden und die eine genau definierte Menge an iPTH-Ag enthalten in die ersten 18 Röhrchen pipetiert werden, wobei eine Probe immer doppelt bestimmt wird. Dann folgen je 200µl der gewonnenen Proben aus den jeweiligen Test-, Vergleichs- und Kontrollgruppen, die ebenfalls als Doppelbestimmung gemessen werden. Auf die Probe werden sofort 100µl des Reagens mit der genau definierten Menge von ^{125}J -IPTH-Ak gegeben. Die Röhrchen werden gründlich gemischt und für 22 Stunden unter einer Arbeitsbank für radioaktive Arbeitsstoffe inkubiert. Nach der Inkubation wird alle Flüssigkeit in einen speziellen Behälter für flüssigen radioaktiven Abfall dekantiert und die restliche Flüssigkeit über Kopf auf eine Unterlage aus Fliesspapier ausgeschüttelt bzw. getrocknet.

Dann werden die Röhrchen mit 2 ml der speziellen Pufferlösung befüllt, durchmischt und sofort dekantiert. Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt.

Anschließend werden die Röhrchen ein weiteres Mal über Kopf auf Fliesspapier getrocknet und anschließend im Gammacounter gemessen.

Alle Arbeitsschritte bei denen radioaktive Reagenzien beteiligt sind werden unter einem speziellen Abzug für Radioaktivität in einem Radioaktivlabor ausgeführt.

3.5.2. Stabilitätstests:

Jede Mikrokapsel aller Test- und Vergleichsgruppen wird, ausgehend vom Tag der Herstellung (Tag 0) bis zum jeweiligen letzten Tag der Reihe, zweimal wöchentlich, d.h. in mindestens 3-tägigen Intervallen vermessen.

Dazu werden die 24-Konkavität-Platten unter ein Mikroskop (Firma Leitz, Germany) gelegt und mittels einer speziellen Kamera (Leica, Germany, MPS 60) und eines digitalisierten Bildanalysesystems (Q500 MC, Nr. 723193, Leica®, Germany) der Durchmesser jeder Kapsel als Doppelbestimmung ausgemessen. Nach dem Vermessen wird jede Kapsel unter dem Mikroskop (Fa. Leitz, Germany) betrachtet und die Beschaffenheit der Oberfläche genau dokumentiert. Dies erfolgt nach folgenden Gesichtspunkten der Unversehrtheit der Oberfläche: intakte Oberfläche, Haarrissbildung, Kapselruptur.

3.5.3. Histologische Analysen

Zur histologischen Analyse werden 2 Kapseln bzw. Gewebepartikel (Nativgruppe) an den Tagen der Probenentnahme für den Radioimmunoassay entnommen. Die Entnahme erfolgt dabei steril mit einem scharfen Löffel (Firma Aesculap). Direkt nach der Entnahme werden die Partikel in Bouin'sche Lösung überführt.

In dieser Fixierlösung werden die Partikel für 24 Stunden in einem Glasfläschchen (Glasflasche mit Schraubverschluß, 10ml, Kobe Labortechnik, Marburg) eingelegt und zwar so, dass das Gewebe vollständig von Lösung bedeckt ist.

Dann wird die Fixierlösung durch mehrmaliges Waschen mit 70% Ethanol aus dem Zentrifugenröhrchen entfernt, so dass die gelbliche Farbe der Pikrinsäure verschwindet. Die Partikel müssen nun für weitere 24 Stunden in 70% Ethanol verbleiben und werden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe werden die Partikel für 24 Stunden in Methylbenzoat (für die Mikroskopie, >99%, Roth) und dann für 5 min., vor dem Einbetten in Paraffin, noch in Xylol (Für die Histologie, >98%, Roth) eingelegt. Nach Entfernen des Xylols werden die Glasfläschchen mit flüssigem Paraffin (DDM Gewebereinbettung, Gießen) gefüllt und in einen Brutschrank solange bei 60°C inkubiert, bis das Paraffin sich wieder vollständig verflüssigt. Dann wird es abgegossen und durch frisches flüssiges Paraffin ersetzt. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, wobei die Partikel mindestens eine Stunde in dem jeweiligen Paraffin im Brutschrank verbleiben. Dann werden sie mit Hilfe des Tissue Tec® (Miles Scientific, Naperville Ill. USA), der Paraffin (DDM Gewebereinbettung, Gießen) verflüssigt und in Metallformen mit

den Präparaten gießt, eingebettet. Die Präparate müssen anschließend in einem Kühlschrank bei 0-5°C gekühlt bzw. aufbewahrt werden. Nach der vollkommenen Aushärtung der Präparate werden sie am Mikrotom (Anglian Scientific 500, Anglian Scientific, Cambridge, England) weiterverarbeitet. Jedes Blöckchen wird völlig durchgestuft, d.h., nach dem Aufbringen eines Schnittes auf einen Objektträger werden die nächsten 15 Schnitte verworfen, um jede Schicht des Präparates untersuchen zu können. Die Objektträger werden dann zur Entparaffinierung der Schnitte in einen Wärmeschrank bei 60°C und für mindestens 6 Stunden gestellt.

Die Schnitte werden mit einer Hämalaun-Eosin-(HE)Färbung nach gängigem Schema gefärbt.

3.6. Auswertung und Statistik

Auswertung der Stabilitätstests

Unter Stabilitätstest fallen einerseits die mikroskopische Vermessung der Kapseln (Quellverhalten) und andererseits die mikroskopische Beurteilung der Kapselintegrität. Diese Daten werden deskriptiv ausgewertet. Dabei werden die Kapseln zur Beschreibung der Kapselintegrität bei jeder Untersuchung den 3 Gruppen (Intaktheit, Haarrissbildung, Kapselruptur) zugeordnet und dokumentiert. Aus den Durchmessern der Kapseln jeder Versuchsgruppe zu jedem Untersuchungszeitpunkt werden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und über den Gesamtverlauf verglichen.

Auswertung der histologischen Analysen

Die Daten werden deskriptiv ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt. Dabei wird der Anteil des nekrotischen Gewebes (Nekroserate) in Prozent verwendet.

Auswertung des Funktionstestes

Die Daten der Parathormonfreisetzung werden auf Normalverteilung überprüft. Bei Normalverteilung erfolgt die statistische Auswertung der Daten mittels des T-Test für verbundene Stichproben. Zur statistischen Auswertung werden die Parathormonkonzentrationen zum jeweiligen Endzeitpunkt jeder Reihe verwendet. Dazu wird aus allen Kapseln einer Versuchsgruppe der Mittelwert

bzw. der Median gebildet. Die Parathormonkonzentrationen der Testgruppen werden jeweils gegen die Vergleichsgruppen getestet. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Bei einem signifikanten Testergebnis wird ein Konfidenzintervall angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Erste Versuchsreihe:

Stabilitätstests

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des FC43 wurden die 4 Testgruppen 1 (a= 0,01%; b= 0,1%; c=1%; d=10% FC43) und eine Vergleichsgruppe *ohne* FC43 untersucht. Dabei wurden Daten zu Quellverhalten und Kapselintegrität über 22 Tage erhoben. Der Durchmesser der Kapseln am ersten Tag bewegte sich zwischen 2,4 und 2,8 mm. In den ersten 72h war eine besonders deutliche Aufquellung der Kapseln zu beobachten, während der Kapseldurchmesser danach nur noch wenig schwankte. Deshalb wurden für die ersten 72h der Mittelwert und die Standardabweichung gesondert angegeben und für den Rest der Zeit noch ein Mittelwert und die Standardabweichung. Die jeweils 2 Mikrokapseln, die sich in einer Konkavität befanden, wurden zu einer Untersuchungseinheit zusammengefasst, da sie sich nicht unterscheiden lassen. Von einer Untersuchungseinheit wurden also an jedem Zeitpunkt 4 Durchmesser erhoben und in einem Mittelwert ausgegeben. Insgesamt wurden über den gesamten Zeitraum 18 Untersuchungseinheiten (36 Mikrokapseln) pro Test- und Vergleichsgruppe beobachtet.

Die Abbildung 5 zeigt die Streuung der Werte der 18 Untersuchungseinheiten die im Folgenden zu einem Mittelwert pro Untersuchungszeitpunkt zusammengefasst wurden. Jeder dargestellte Wert entspricht dem Mittelwert der Doppeltvermessung der 2 Kapseln pro Konkavität (er errechnet sich also aus 4 Werten).

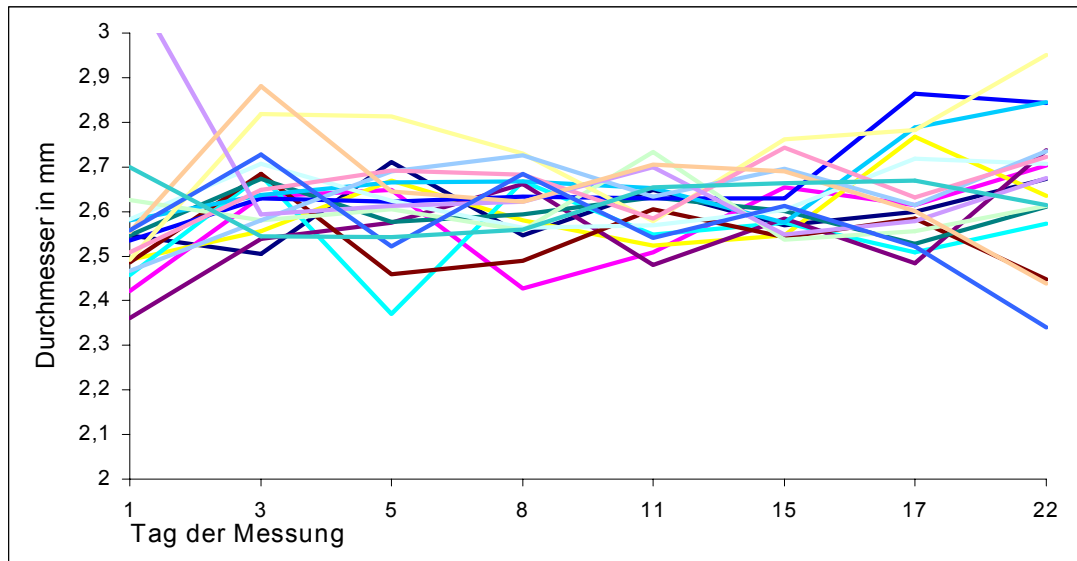


Abbildung 5: Quellverhalten der Vergleichsgruppe 1 ohne FC 43; Darstellung von 18 Untersuchungseinheiten

Die Abbildung 6 zeigt das Quellverhalten der Testgruppen 1 und der Vergleichsgruppe 1 über den Versuchszeitraum von 22 Tagen. Dabei wurden für jede Versuchsgruppe die Mittelwerte aus 18 Versuchseinheiten, also von 36 Mikrokapseln, dargestellt.

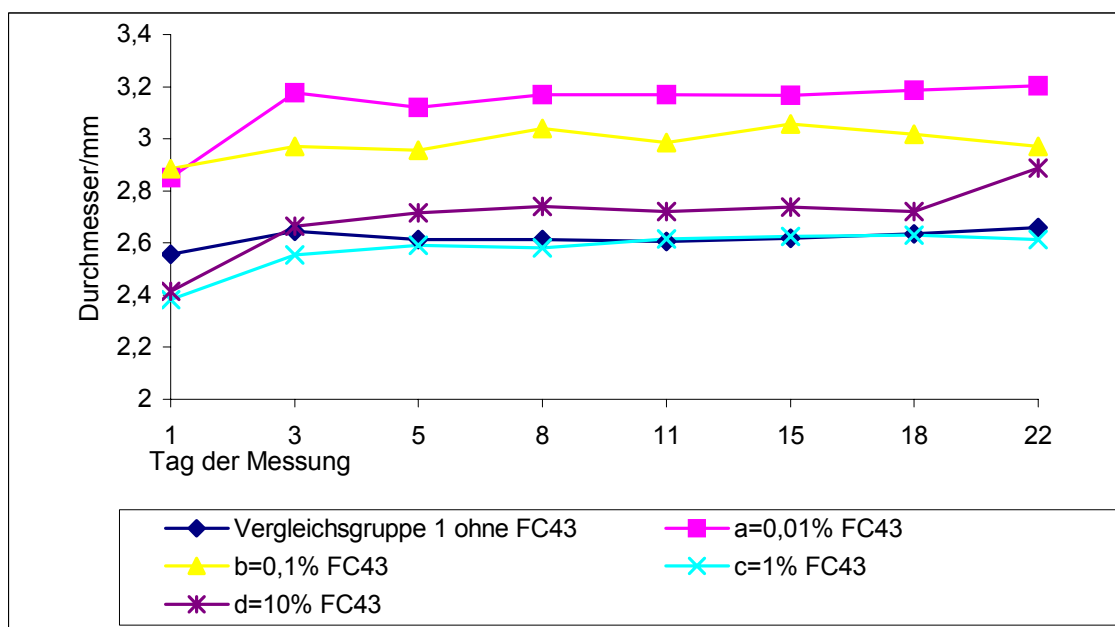


Abbildung 6: Quellverhalten von Alginatkapseln ohne FC 43 und mit Zusatz von 0,01; 0,1; 1; 10 % FC 43; Mittelwerte aus jeweils 36 Mikrokapseln pro Versuchsgruppe

Die Auswertung der Daten zeigt Tabelle 1:

	Ausgangs-Größe	Nach 72h	72h-Tag22	Quellung initial (72h)	Quellung über 22Tage
Vergleichsgruppe1 (ohne FC43)	2,56mm +/- 0,16mm	2,64mm +/- 0,1mm	2,62mm +/- 0,2mm	3%	2,3%
Testgruppe 1a (0,01% FC43)	2,85mm +/- 0,08mm	3,17mm +/- 0,03mm	3,16mm +/- 0,02mm	11%	11%
Test Gruppe 1b (0,1% FC43)	2,88mm +/- 0,1mm	2,97mm +/- 0,05mm	2,99mm +/- 0,03mm	3%	4%
Testgruppe 1c (1% FC43)	2,38mm +/- 0,05mm	2,55mm +/- 0,05mm	2,6mm +/- 0,02mm	7%	9%
Testgruppe 1d (10% FC43)	2,41mm +/- 0,06mm	2,66mm +/- 0,08mm	2,74mm +/- 0,07mm	10%	14%

Tabelle 1: Quellverhalten der 1. Versuchsreihe; Darstellung der Kapselgröße als Durchmesser; Angabe der Aufquellung als Mittelwert +/- Standardabweichung und in Prozent bezogen auf die Ausgangsgröße

Die geringste Aufquellung der Kapseln war damit bei der Vergleichsgruppe ohne FC43 zu beobachten, gefolgt von der Testgruppe mit 0,1% FC43. Die anderen Testgruppen zeigten ein deutlich ausgeprägteres Quellverhalten.

An denselben Versuchsgruppen wurden zu jedem obengenannten Messzeitpunkt Untersuchungen zur Integrität der Kapseln angestellt. Kriterium dafür war die mikroskopische Beurteilung der Kapseloberfläche. Es war zu beobachten, dass das FC 43 sich mit zunehmender Konzentration (10%,1%) deutlich schlechter mit dem Alginat vermischte und der Kapseloberfläche ein gewelltes, wie mit Schlieren überzogenes Aussehen verlieh. Bei allen Kapseln mit FC 43 sah man mikroskopisch kleinste Gasblässchen in der Gelschicht. Die Kapseln wurden zur Beurteilung der Integrität in 3 Kategorien unterteilt: intakt, Haarrisse, Kapselruptur. Die Abbildung 7 zeigt die beobachtete Kapselintegrität der Versuchsgruppen der 1. Versuchsreihe über den gesamten Versuchszeitraum von 22 Tagen. Dabei wurden jeweils 18 Versuchseinheiten (n=36 Mikrokapseln) zu jedem Zeitpunkt untersucht. Die Kapseln der Vergleichsgruppe 1 waren über den Zeitraum der ersten Woche alle stabil, während sich danach erste Einrisse zeigten. Bereits ab der zweiten Woche traten rupturierte Kapseln auf. Insgesamt blieben aber 57% der Kapseln über 22 Tage intakt; der Anteil der rupturierten Kapseln lag am Tag 22 bei 13%, der von Kapseln mit Haarrissen bei 30%. Bei den Mikrokapseln der Testgruppen 1a und 1b (0,01% und 0,1% FC43) traten im Gegensatz dazu nach drei Wochen noch keine rupturierten Kapseln auf. Der Anteil der intakten Kapseln lag bei der Testgruppe 1a am Tag 22 aber nur bei 48%. Zu diesem Zeitpunkt wiesen 52% der Kapseln Haarrisse auf. Der Anteil der intakten Kapseln ohne Haarrisse am Tag 22 war bei der Testgruppe 1b (0,1% FC43) mit 81% am größten. Die Testgruppe 1d (10% FC43) verhielt sich zur Vergleichsgruppe 1 ungefähr gleich, der Anteil der rupturierten Kapseln lag am Tag 22 aber höher bei 33%. Bei der Testgruppe 1c (1% FC43) waren am Tag 22 alle Kapseln rupturiert.

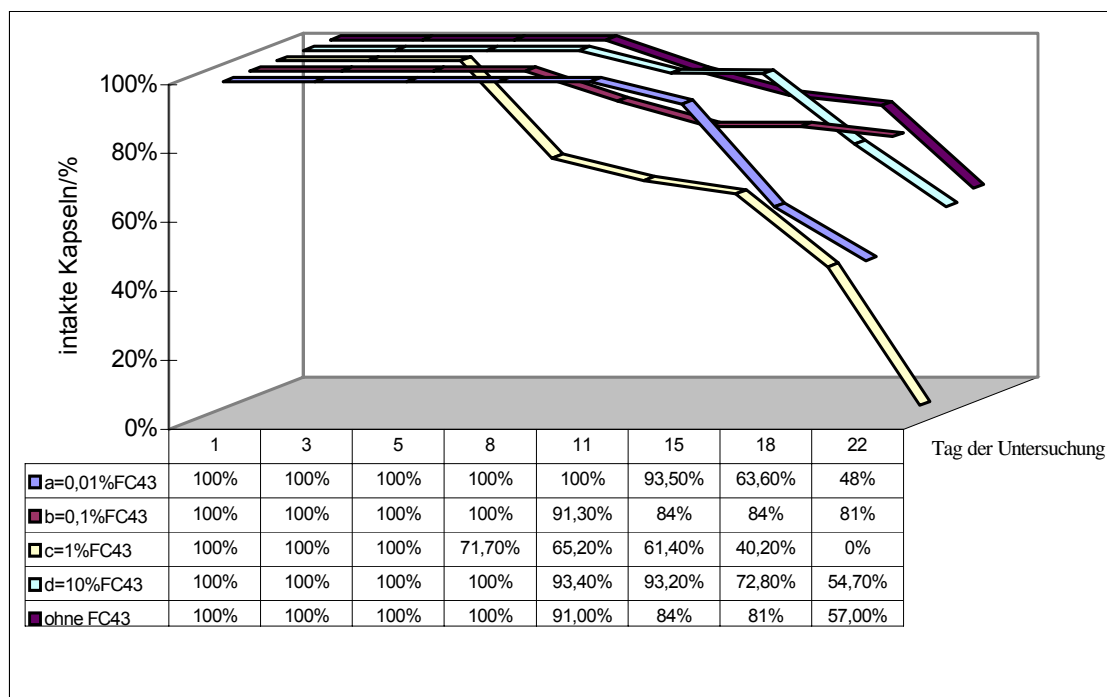


Abbildung 7: Kapselintegrität von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 und mit Zusatz von 0,01; 0,1; 1; 10 % FC 43; 18 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe

Die genaue Darstellung der Kapselintegrität wird hier nur für die Vergleichsgruppe 1 und die Testgruppe 1b gezeigt, da nur diese Daten für die folgenden Versuchsreihen von Bedeutung sind. Die Diagramme zu den übrigen Testgruppen 1 finden sich im Anhang.

Die Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Kapseln der Testgruppe 1b auf die Gruppen zur Beurteilung der Kapselintegrität über den gesamten Versuchszeitraum.

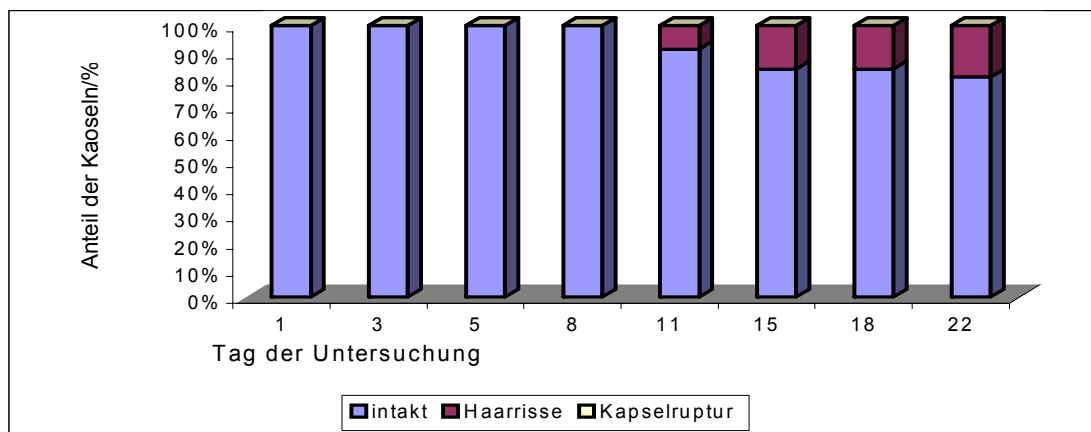


Abbildung 8: Kapselintegrität, Testgruppe 1b (Alginatkapseln mit Zusatz von 0,1% FC 43; 18 UE)

Die Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Kapseln der Vergleichsgruppe 1 auf die Gruppen zur Beurteilung der Kapselintegrität (intakt, Haarrisse, Kapselruptur) zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten.

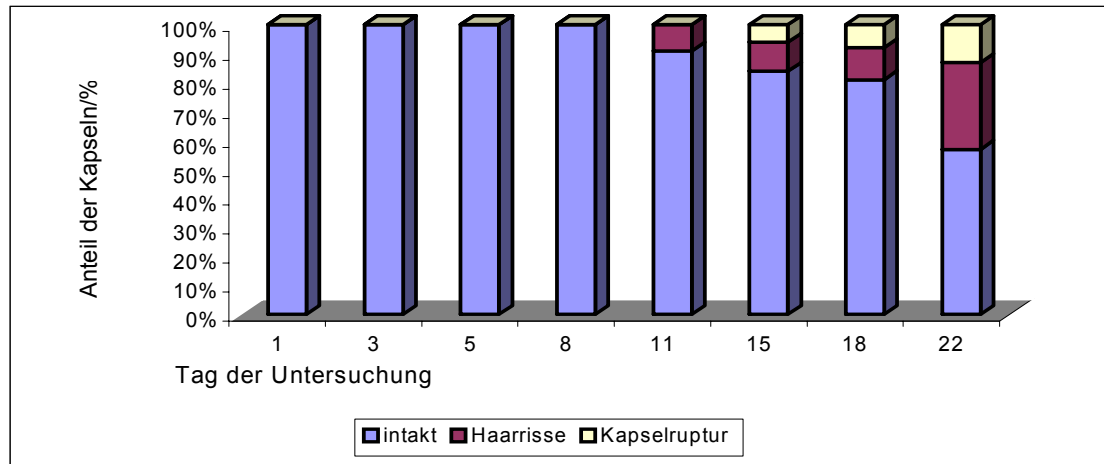


Abbildung 9: Kapselintegrität, Vergleichsgruppe 1 (Alginatkapseln ohne FC 43; 18 Untersuchungseinheiten)

Insgesamt wies die Vergleichsgruppe 1 in der Untersuchung des Quellverhaltens die beste Stabilität bzw. die kleinste Aufquellung und Schwankungsbreite auf, aber sie war bei Beurteilung der Kapselintegrität nur im mittleren Bereich anzusiedeln und zwar zwischen den Testgruppen 1a und 1b mit niedrigen Konzentrationen von FC43 (0,01; 0,1%) und den Testgruppen 1c und 1d mit hohen Konzentrationen von FC43 (1%; 10%). Berücksichtigte man Quellverhalten und Kapselintegrität so erschien eine Konzentration von 0,1% FC43 am günstigsten, da sie der Vergleichsgruppe im Quellverhalten weitgehend entsprach, während sie bei der Kapselintegrität besser bewertet werden konnte.

Die zweite Versuchsreihe wurde deshalb mit nur einer Testgruppe mit einem Zusatz von 0,1% FC43 und einer weiteren Vergleichsgruppe ohne Zusatz von FC 43 über einen Versuchszeitraum von 8 Wochen angelegt.

Funktionstest

Das Sekretionsverhalten des mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsengewebes wurde mittels RIA gemessen, der nur für einen Bereich zwischen 10 und 2000 pg/ml definiert war. Bei allen beobachteten Kapseln ließ sich in den ersten

Tagen der Kultur eine überschießende Parathormonsekretion feststellen, die die definierte Grenze des RIA nach oben hin überstieg. Solche Proben mussten durch Verdünnung in einen messbaren Bereich gebracht werden. Auf dieses Verdünnen der Proben wurde bei der Versuchsreihe 1 verzichtet, da von hauptsächlichlicher Bedeutung die Sekretion zum Ende des Versuchszeitraumes, also an Tag 15 und Tag 22 war. Werte die über der oberen definierten Grenze des RIA lagen, wurden in dem Diagramm als Wert von 2000 pg/ µl dargestellt. Zur Erstellung des Diagramms wurden die Mediane aus den jeweils untersuchten 18 Versuchseinheiten (36 Mikrokapseln) herangezogen, da die Standardabweichung der Mittelwerte zu groß war. Es zeigt sich sowohl in der Vergleichsgruppe 1 ohne FC43, als auch in allen Testgruppen 1 ein Ausgangswert über der oberen definierten Grenze des RIA, so dass dieser gleich 2000 gesetzt wird.

Die Streuung der Mittelwerte für die Vergleichsgruppe 1 ohne FC43 zeigt die Abbildung 10.

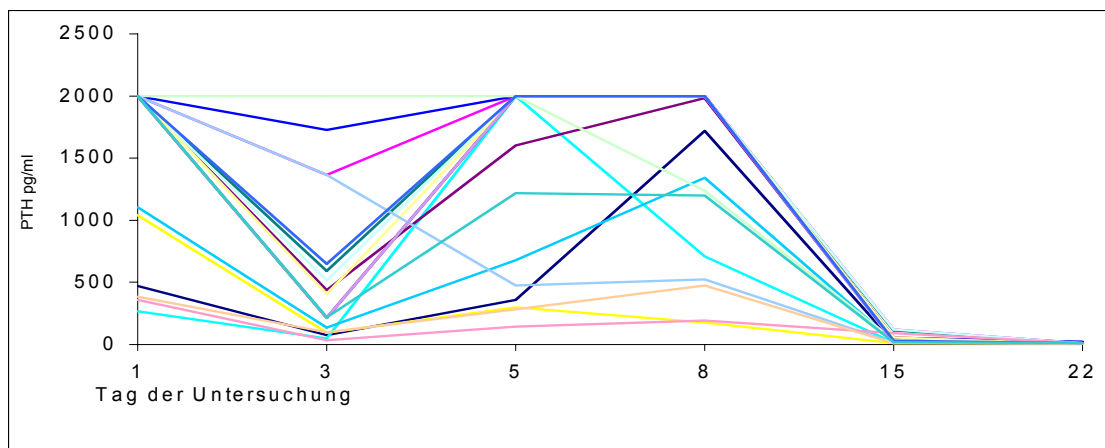


Abbildung 10: PTH-Sekretion von mikroenkapsuliertem kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43; Mittelwert von 18 Untersuchungseinheiten

Die Testgruppe 1a (0,01% FC43) hatte, wie auch alle anderen Testgruppen 1, an Tag 1 einen Ausgangswert von mehr als 2000pg/ml bei einem Probenvolumen von 1500 ml pro Versuchseinheit, d.h. pro 2 Kapseln die sich in einer Konkavität befanden und einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Die PTH-Sekretion war an Tag 3 auf 913 pg/ml abgesunken und lag bereits an Tag 5 nur noch bei 25 pg/ml. An Tag 8 war der Wert ungefähr gleich bleibend mit 21 pg/ml, bereits an Tag 15 lag er bei 0. In der Testgruppe 1b (Zusatz von 0,1% FC43) fiel die PTH-Sekretion bis zum Tag 8 auf einen Wert von 36 pg/ml

ab, stieg aber am Tag 15 an auf 111 pg/ml und lag am Tag 22 noch bei 91 pg/ml. In der Testgruppe 1c (1% FC43) sank die PTH-Sekretion über den Versuchszeitraum stetig auf einen Wert von 15 pg/ml am Tag 22 ab.

Bei der Testgruppe 1d (10% FC43) zeigte sich am Tag 8 eine PTH-Sekretion von 112 pg/ml, Tag 15 151 pg/ml und schließlich ein Absinken am Tag 22 auf 46 pg/ml. Die Vergleichsgruppe 1 ohne FC43 hatte ebenfalls einen Ausgangswert von mehr als 2000 pg/ml. Am Tag 3 fiel die PTH-Sekretion auf 313 pg/ml ab, an Tag 5 erreichte sie wieder Werte über 2000 pg/ml. Nach 8 Tagen bewegte sich der Wert mit 1850 pg/ml in einem messbaren Bereich (ohne Verdünnung der Proben). An Tag 15 war die Sekretion auf 30 pg/ml abgefallen und fiel bis zum Ende des Versuchszeitraumes an Tag 22 auf 10 pg/ml ab.

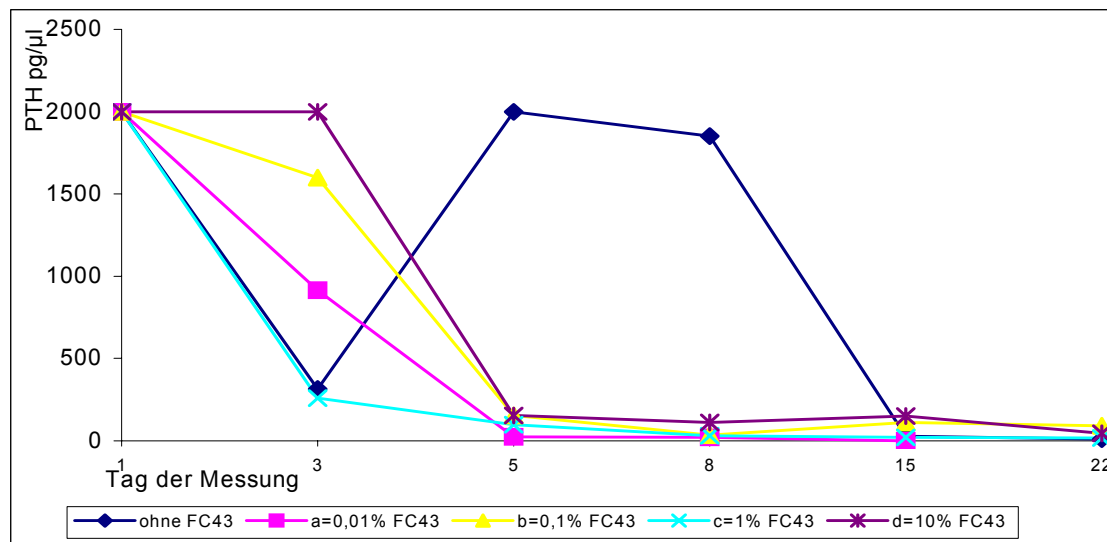


Abbildung 11: PTH-Sekretion von mikroenkapsuliertem kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe ohne FC 43 und mit Zugabe von 0,01; 0,1; 1; 10% FC 43 (Mittelwerte aus 18 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Die statistische Auswertung der Daten mittels des T-Test für verbundene Stichproben mit dem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ lieferte für die Testgruppen 1a, 1b und 1c ein signifikantes Testergebnis. Dabei führte die Konzentration der Testgruppe 1a von 0,01% FC43 zu einer signifikanten Verschlechterung der Funktion des mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsengewebes gemessen an der Menge des sezernierten Parathormon. Für die Testgruppe 1b konnten Mittelwert +/- Standardabweichung und das Konfidenzintervall mit 98 pg/ml +/- 33 pg/ml [131; 65] angegeben werden.

Histologie

In der 1. Versuchsreihe wurden Proben zur histologischen Aufarbeitung zum ersten Mal am Tag 8 entnommen und zwar nur zwei Kapseln. Als wesentlich für die Auswertung der 1. Versuchsreihe wurde die Bestimmung der Nekroseraten zum Endzeitpunkt der Versuchsreihe zu betrachten, also am Tag 22. Zu diesem Zeitpunkt lag nur die Testgruppe 1b (0,1% FC43) mit einer Nekroserate von 50% unter der maximal möglichen Nekroserate (100%: kein vitales Gewebe).

Zusammen mit den Ergebnissen der anderen Untersuchungen (Quellverhalten, Stabilität, PTH-Sekretion) wurden die Versuche deshalb mit einer FC43-Konzentration von 0,1% weitergeführt.

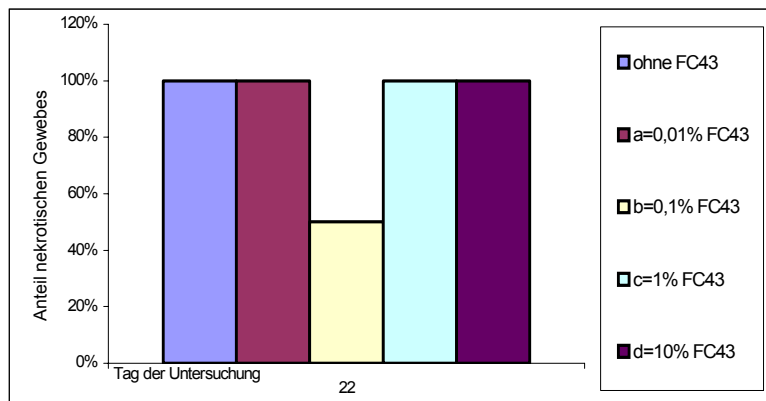


Abbildung 12: Nekroserate von kryokonserviertem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe mit 0,01;0,1; 1;10 % FC43 und ohne Zusatz von FC43; Darstellung des Anteils des nekrotischen Gewebes in Prozent (18 Untersuchungseinheiten am Tag 22)

4.2. Zweite Versuchsreihe

Stabilitätstest

Da die Kapseln über einen Zeitraum von 8 Wochen untersucht wurden und wöchentlich 2 Kapseln zur histologischen Aufarbeitung entnommen wurden, konnten insgesamt nur 22 Mikrokapseln in 11 Versuchseinheiten bis zum Versuchsende untersucht werden.

Abbildung 13 zeigt das Quellverhalten der Vergleichsgruppe 2 und der Testgruppe 2 über den gesamten Versuchszeitraum von 60 Tagen. Bei den

Datenpunkten handelt es sich um die Mittelwerte der Ausmessungen der 11 Versuchseinheiten.

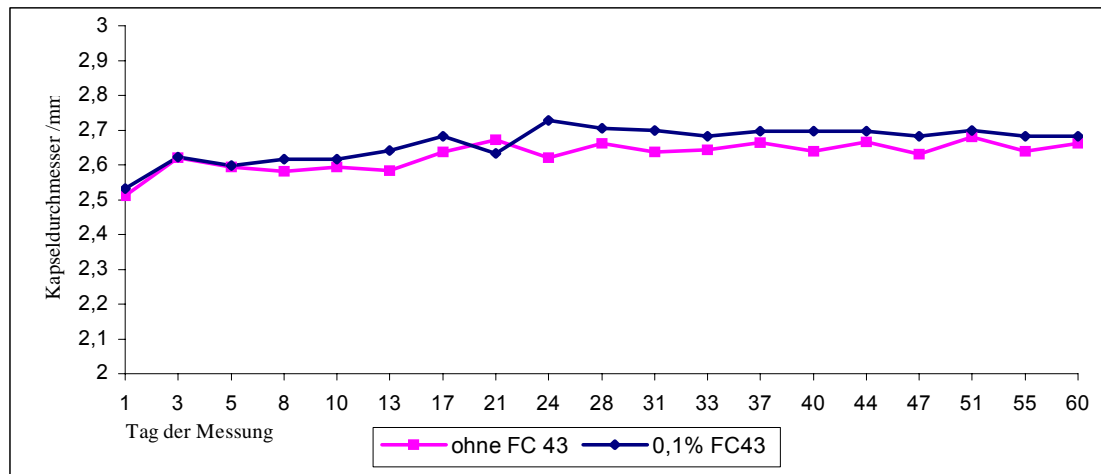


Abbildung 13: Quellverhalten von Alginatkapseln ohne, und mit Zusatz von 0,1% FC43 (11 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Tabelle 2 zeigt die Auswertung der Daten.

	Ausgangs-Größe	nach 72h	72h-Tag 60	Quellung initial (72h) in %	Quellung über 60Tage
Ver- gleichs- gruppe2 Ohne	2,51mm +/- 0,07mm	2,62mm +/- 0,06mm	2,63mm +/- 0,03mm	4%	5%
Test- gruppe 2 O,1% FC43	2,53mm +/- 0,08mm	2,62mm +/- 0,13mm	2,67mm +/- 0,03mm	4%	6%

Tabelle 2: Quellverhalten von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC 43; 11 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe; Darstellung der Kapselgröße als Durchmesser; Angabe als Mittelwert +/- Standardabweichung und in Prozent bezogen auf die Ausgangsgröße

Die Daten zeigen, dass die beiden Gruppen der 2. Versuchsreihe sich bezüglich ihres Quellverhalten weitestgehend glichen.

Abbildung 14 zeigt den Verlauf des Anteiles der intakten Kapseln von Testgruppe 2 gegenüber der Vergleichsgruppe 2 über den gesamten Versuchszeitraum von 60 Tagen. Es wurden jeweils 22 Mikrokapseln in jeder Gruppe beobachtet.

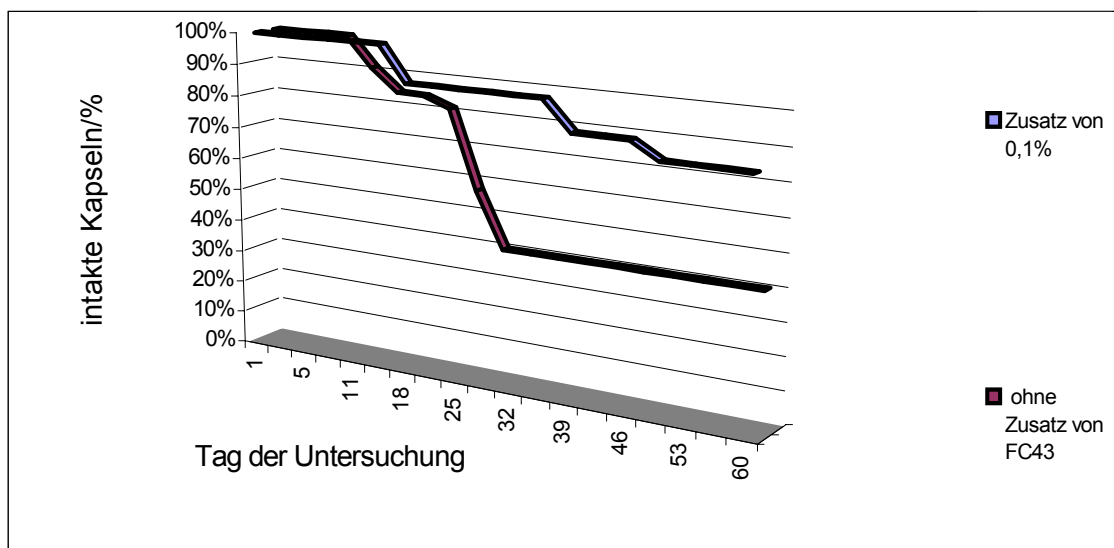


Abbildung 14: Kapselintegrität von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC43 (11 Untersuchungseinheiten)

Bei den Kapseln der Testgruppe 2 (Abbildung 15) mit Zusatz von 0,1 % FC43 lag der Anteil der intakten Kapseln über den gesamten Versuchszeitraum höher, als bei der Vergleichsgruppe. Die Kapseln waren nicht über die letzten 30 Tage stabil sondern veränderten sich auch in der zweiten Versuchshälfte noch. Erste Veränderungen an den Kapseln waren am Tag 11 zu beobachten. Rupturierte Kapseln waren am Tag 39 zu beobachten und ihr Anteil veränderte sich bis zum Tag 60 nicht mehr. Insgesamt war auch der Anteil der Kapseln mit Haarrissen über jeweils 10-20 Tage konstant. Der Anteil der intakten Kapseln lag am Tag 60 (Ende des Versuchszeitraumes) noch bei 75%. Er lag damit 35% höher als bei der Vergleichsgruppe ohne FC43. Der Anteil der rupturierten Kapseln lag bei der Testgruppe am Tag 60 um 15% niedriger, der Anteil der Kapseln mit Haarrissen um 20%.

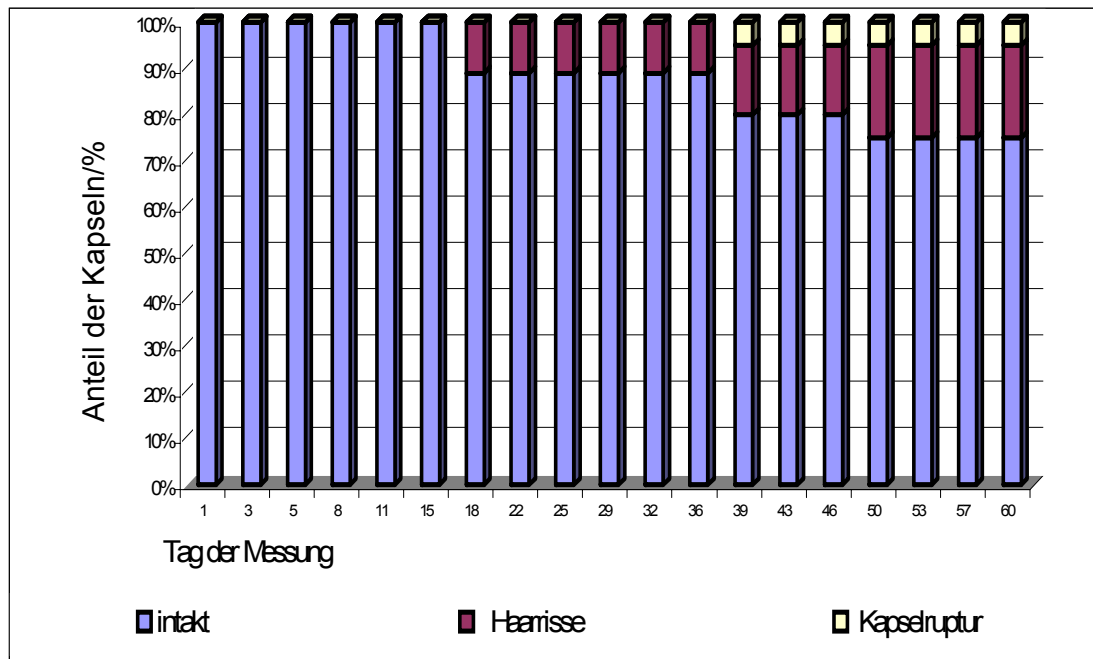


Abbildung 15: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit 0,1% FC 43 (11 UE)

Die Abbildung 16 zeigt die Verteilung der Kapseln zu jedem Untersuchungszeitpunkt auf die 3 Gruppen bezüglich der Kapselintegrität.

Die Kapseln der Vergleichsgruppe ohne FC43 blieben dabei bis Tag 8 stabil. Danach traten bei einem Teil der Kapseln Einrisse auf. Bis zum Tag 29 wuchs der Anteil der beschädigten Kapseln an, während danach ein konstanter Anteil von 40% über den verbleibenden Versuchszeitraum intakt blieb. Der Anteil der beschädigten Kapseln teilte sich wie folgt auf. Rupturierte Kapseln traten ab Tag 15 auf, ihr Anteil stieg bis zum Tag 29 auf 20%. Der Anteil der Kapseln mit Haarrissen stieg bis zum Tag 29 auf 40% an. Nach dem Tag 29 traten keine Veränderungen mehr ein.

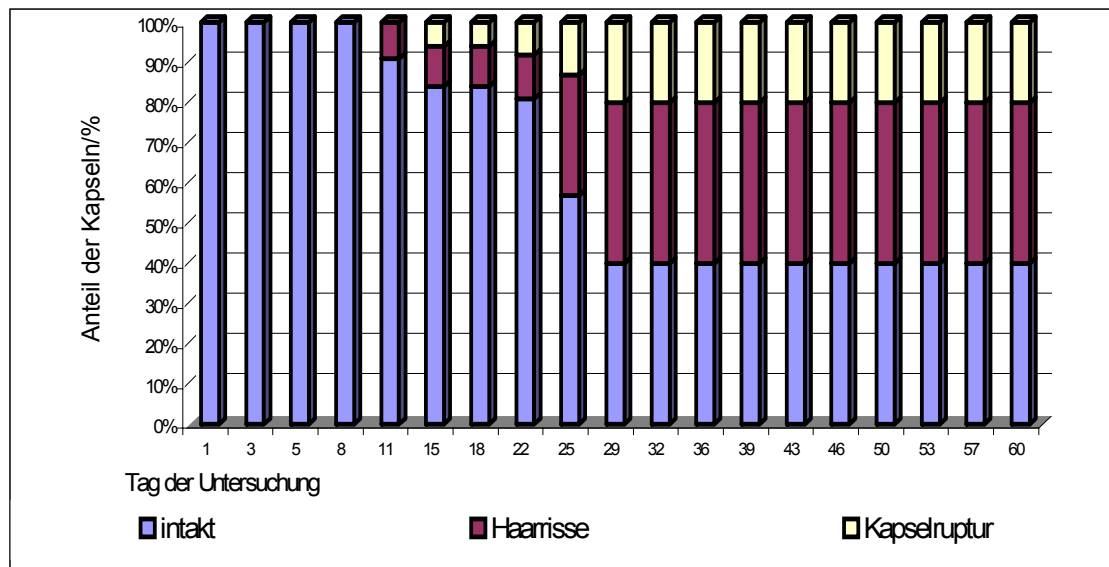


Abbildung 16: Kapselintegrität von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 (18 Untersuchungseinheiten)

Die Untersuchungen dieser Versuchsgruppe bestätigten das Ergebnis der Versuchsgruppe 1.

FC 43 in einer Konzentration von 0,1% als Zusatz zu Alginat vor der Mikroenkapsulierung hatte einen stabilisierenden Effekt auf die Oberflächen der Kapseln, der zu einer Abnahme des Anteil beschädigter Kapseln im Vergleich zu einer Gruppe von Kapseln ohne Zusatz von FC43 über einen Versuchszeitraum von 8 Wochen führte.

Dabei hatte es scheinbar keinen Einfluss auf das Quellverhalten der Kapseln, da ein Unterschied von 1% bei einem Vergleich der Mittelwerte von Tag 3 bis Tag 60 als vernachlässigbar erscheint.

Funktionstest

Zur radioimmunologischen Untersuchung dieser Versuchsreihe wurden die Proben vor der Bestimmung verdünnt. So konnten Werte über 2000 pg/ml gemessen werden.

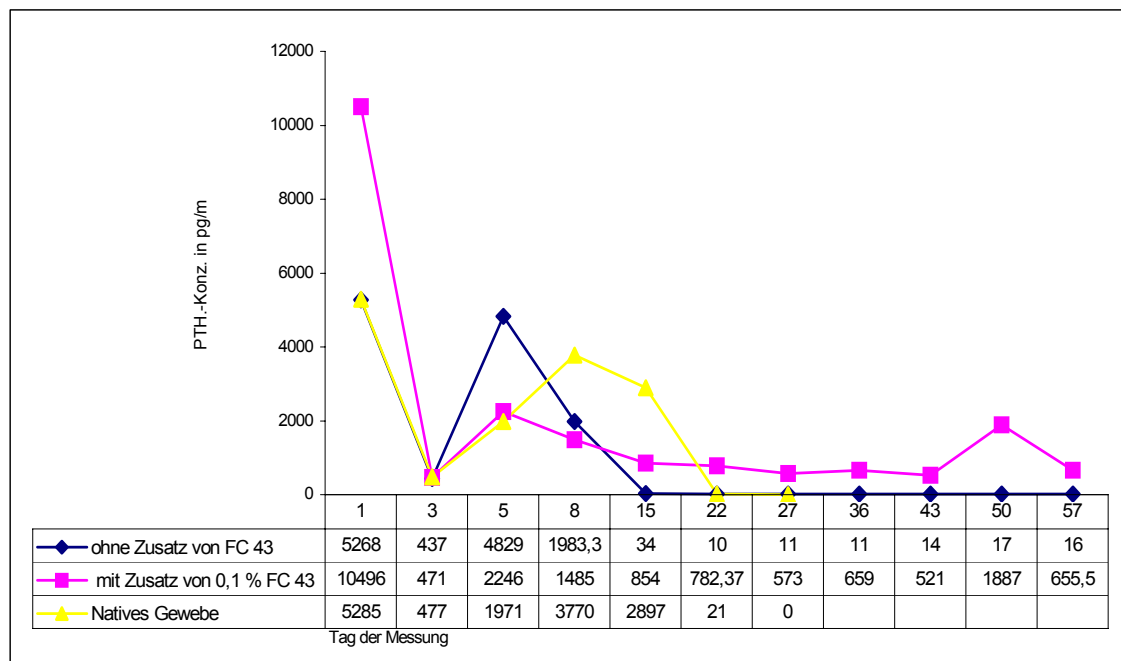


Abbildung 17: PTH-Sekretion von kryokonserviertem nativen und mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe mit 0,1% FC43 und ohne Zusatz von FC 43 (Mittelwerte aus 11 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Die Abbildung 17 zeigt für alle drei untersuchten Gruppen hohe Ausgangswerte an Tag 1. Dabei lagen das native Gewebe und die Vergleichsgruppe 2 ungefähr gleich mit Werten um 5200 pg/ml. Die Testgruppe 2 mit 0,1% FC43 hatte einen doppelt so hohen Ausgangswert von 10500 pg/ml. An Tag 3 waren alle drei Gruppen auf Werte um die 400 pg/ml abgefallen.

Die Kontrollgruppe stieg bis zum Tag 8 auf einen Wert von 3770 pg/ml an, um dann kontinuierlich pro Woche um ca. 2000 pg/ml abzufallen auf einen Wert von nur noch 21 pg/ml am Tag 22. Im Folgenden ließ sich aus den Proben kein Parathormon mehr bestimmen, die Sekretion war erloschen.

Die Vergleichsgruppe 2 stieg ähnlich der Kontrollgruppe am Tag 5 auf einen Wert von 4829 pg/ml an, fiel dann aber steiler ab. Sie erreichte bereits am Tag 15 einen Wert von 34 pg/ml und wies bis zum Versuchsende nur noch Werte zwischen 10-17 pg/ml auf.

Der Verlauf der Testgruppe 2 wies ebenfalls einen Anstieg zum Tag 5 und ein darauffolgendes Abfallen auf, wenn auch in seiner Ausprägung deutlich geringer. So sanken die Werte bis zum Tag 57 nicht unter 500 pg/ml und am Tag 50 wurde sogar noch ein Spitzenwert von 1880 pg/ml erzielt.

Zur statistischen Auswertung wurde zuerst die Vergleichsgruppe 2 gegen die Kontrollgruppe getestet. Weiter wurde dann die Testgruppe 2 gegen die Vergleichsgruppe 2 getestet. Das statistische Verfahren blieb gleich. Der T-Test für verbundene Stichproben mit dem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ ergab für den Vergleich der Vergleichsgruppe 2 mit der Kontrollgruppe ein signifikantes Ergebnis mit dem Konfidenzintervall 41 pg/ml +/- 33pg/ml.

Für den Vergleich der Testgruppe 2 mit der Vergleichsgruppe 2 ergab sich ein signifikantes Ergebnis mit dem Mittelwert 570pg/ml +/- 429 pg/ml.

Histologie

Abbildung 18 zeigt die in der 2. Versuchsreihe ermittelten Nekroseraten für die letzten 22 Tage des Versuchszeitraumes.

Es werden nur die Daten des zweiten Teiles des Versuchszeitraumes dargestellt, da diese eindrucksvoller die Unterschiede zwischen Vergleichsgruppe 2 und Testgruppe 2 zeigen. So war am Tag 43 das untersuchte Gewebe der Vergleichsgruppe bereits zu 100% nekrotisch, bei der Testgruppe 2 aber noch 30% des Gewebes vital. An den Tagen 50 und 57 stieg die Nekroserate zwar auf 85% an, lag bei der Vergleichsgruppe jedoch gleichbleibend bei 100%. Bewertete man die Tendenz der Versuchsgruppen, so schnitt die Testgruppe 2 eindeutig besser ab als die Vergleichsgruppe 2. Das native Gewebe der Kontrollgruppe war zu den dargestellten Zeitpunkten zu 100% nekrotisch.

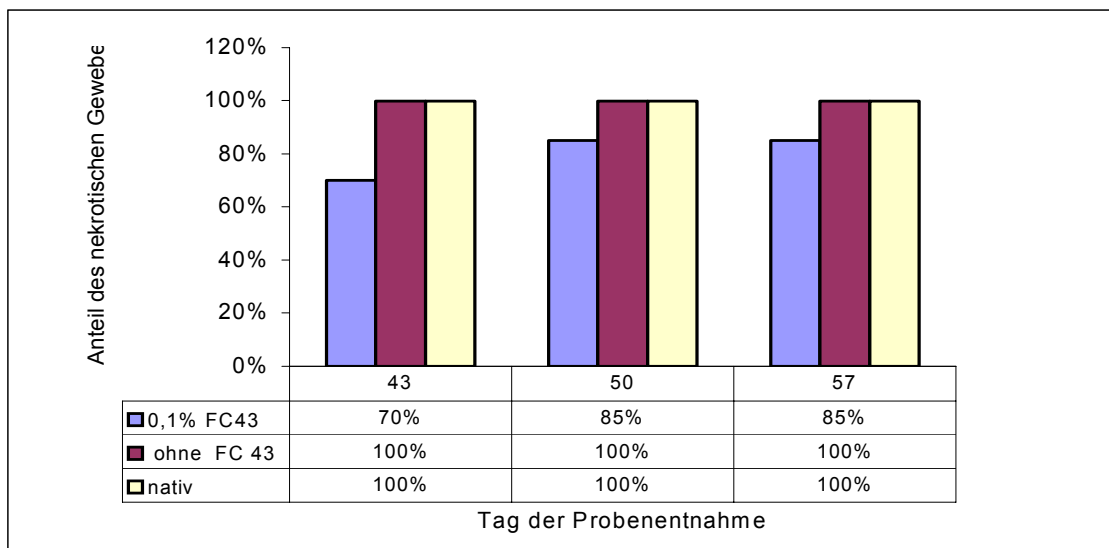


Abbildung 18: Nekroserate von kryokonserviertem nativen und mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC 43; Anteil des nekrotischen Gewebes von 11 Untersuchungseinheiten in Prozent; Darstellung der Werte für die 8. Versuchswoche

4.3. Dritte Versuchsreihe

Stabilitätstest

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei verschiedenen Gewebetypen (kryokonserviert versus frisch) zu überprüfen wurde eine weitere Versuchsreihe über 8 Wochen mit einer Testgruppe 3 (mit 0,1 % FC43) und mit einer Vergleichsgruppe 3 ohne FC43 angelegt. Der Unterschied zur 2.Versuchsreihe bestand lediglich darin, dass das zur Mikroenkapsulierung verwendete Gewebe frisch und nicht kryokonserviert war. Die Versuchsreihe wurde mit 96 Mikrokapseln angelegt. Um das Quellverhalten und die Kapselintegrität über die vollen 8 Wochen beurteilen zu können wurden 16 Untersuchungseinheiten (32 Mikrokapseln) beobachtet.

Abbildung 19 zeigt Mittelwerte aus den gemessenen Durchmessern von 32 Mikrokapseln der Versuchsgruppen der 3. Versuchsreihe zu jedem Untersuchungszeitpunkt.

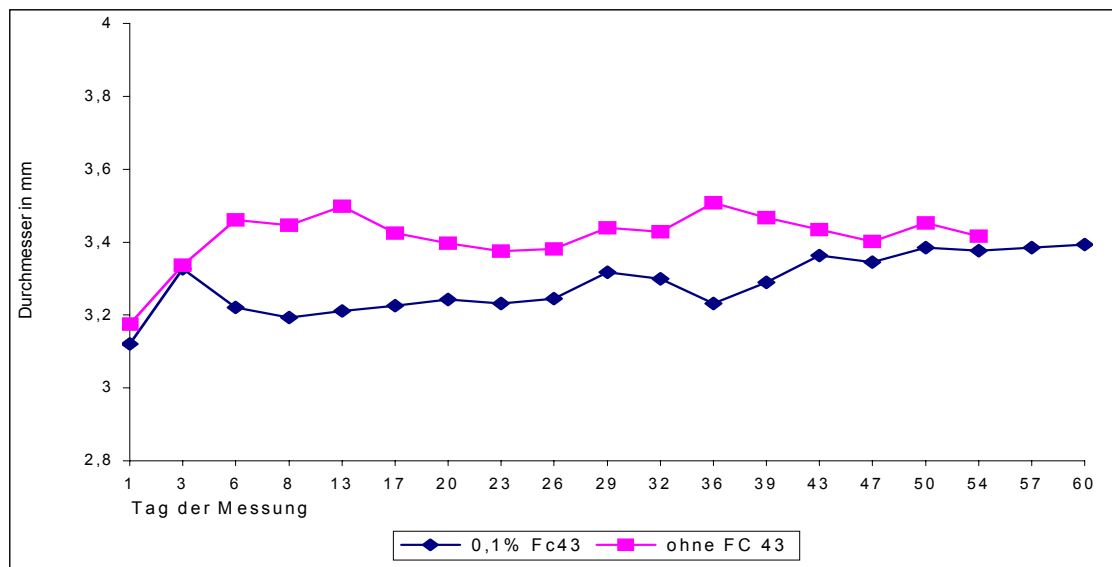


Abbildung 19: Quellverhalten von Alginatkapseln mit 0,1% FC43 und ohne Zusatz von FC 43; frisches Gewebe (Mittelwerte aus 16 Untersuchungseinheiten)

Die Auswertung der Daten zeigt Tabelle 3:

	Ausgangs-Größe	nach 72h	72h-Tag 60	Quellung Initial (72h)	Quellung gesamt
Vergleichsgruppe 3 ohne FC43	3,17 mm +/- 0,14 mm	3,33 mm +/- 0,14 mm	3,42 mm +/- 0,04 mm	5%	8%
Testgruppe 3 0,1% FC43	3,12 mm +/- 0,12 mm	3,32 mm +/- 0,14 mm	3,29m m+/- 0,07m m	6,5 %	5,5 %

Tabelle 3: Quellverhalten der Versuchsgruppen der 3.Versuchsreihe; Darstellung der Kapselgröße als Durchmesser; Angabe als Mittelwert +/- Standardabweichung und in Prozent der Ausgangsgröße; 16 Untersuchungseinheiten

Diese Versuchsreihe wies im Gegensatz zu den vorherigen Versuchsreihen Unterschiede auf. Die Aufquellung der Kapseln der Vergleichsgruppe 3 ohne

FC43 war höher und erreichte auch ihren Maximalpunkt nicht am Tag 3 sondern erst am Tag 6. Der Kapseldurchmesser nahm also über den doppelten Zeitraum zu, während er sich von Tag 6 bis Tag 54 nur wenig veränderte. Die Aufquellung der Kapseln bis Tag 6 lag bei 9% und überstieg die Werte der Vergleichsgruppen 1 und 2 um den Faktor 2 bis 3. Abbildung 20 zeigt den Anteil der intakten Kapseln der Versuchsgruppen der 3. Versuchsreihe über den Versuchszeitraum von 60 Tagen.

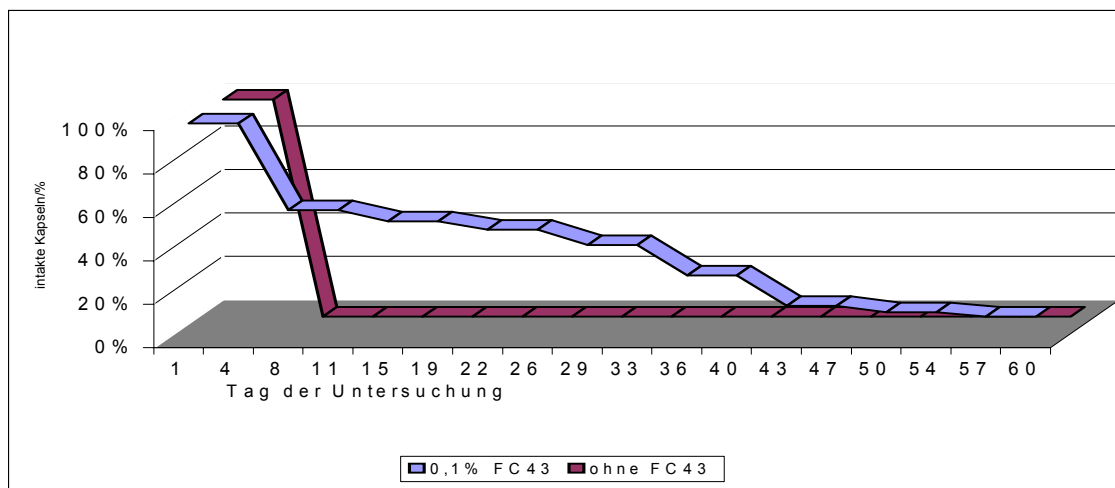


Abbildung 20: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit 0,1% FC43 und ohne Zusatz von FC 43; frisches Gewebe (16 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Man kann aus dem Überblick über die Kapselintegrität bereits erkennen, dass beide Versuchsgruppen eine deutlich verminderte Stabilität im Vergleich zu den Versuchsreihen 1 und 2 aufwiesen. Es zeigte sich aber auch ein deutlicher Unterschied zwischen der Versuchsgruppe mit FC 43 und der Vergleichsgruppe ohne FC 43.

In der Vergleichsgruppe 3 blieben die Kapseln nur über 4 Tage intakt und wiesen im Folgenden alle Haarrisse auf. Am Tag 15 traten die ersten rupturierten Kapseln auf, deren Anzahl kontinuierlich anstieg. Am Tag 57 waren bereits alle Kapseln rupturiert. Es wurden deshalb keine Vermessungen der Durchmesser (Quellverhalten) und keine Inkubation zur Gewinnung von Proben für den Radioimmunoassay mehr durchgeführt, sondern die Kapseln vorzeitig zur histologischen Aufarbeitung entnommen. Die Vergleichsgruppe 3

wies ein deutlich schlechteres Stabilitätsverhalten auf als die ihr vorangegangenen Vergleichsgruppen 1 und 2. Die graphische Darstellung findet sich im Anhang.

Abbildung 21 zeigt den Verlauf der Kapselintegrität für die Testgruppe 3.

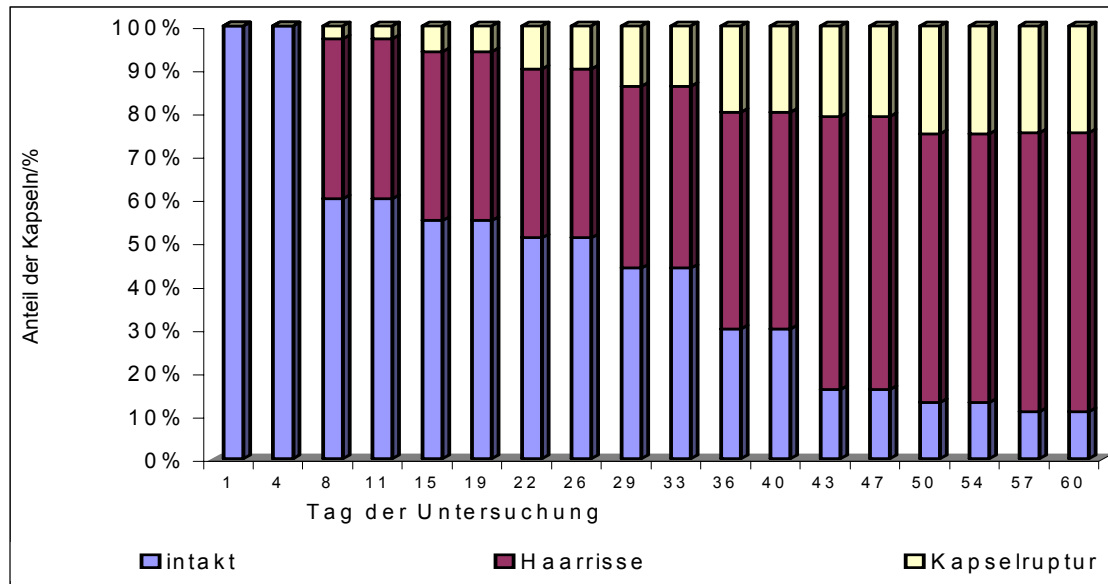


Abbildung 21: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zugabe von 0,1% FC 43; frisches Gewebe (16 Untersuchungseinheiten)

Die Testgruppe 3 mit FC43 erzielte bessere Ergebnisse. Alle Kapseln blieben wie bei der Vergleichsgruppe über die ersten 5 Tage intakt, danach traten Haarrisse bei 37% der Kapseln auf und nicht, wie bei der Vergleichsgruppe 3, bei 100%. Allerdings zeigten sich bereits am Tag 5 erste rupturierte Kapseln, deren Anteil zwar stetig wuchs aber am Tag 60 nur 25 % der gesamten Kapseln ausmachte. Der Anteil der intakten Kapseln am Tag 60 war mit 11% zwar klein, aber vorhanden und zeigte, dass wenigstens einige der Kapseln über 60 Tage stabile Eigenschaften besaßen. Den größten Anteil machte die Gruppe der Kapseln mit Haarrissen aus, so dass in der Testgruppe alle Untersuchungen bis zum Tag 60 durchgeführt wurden.

Funktionstest

Abbildung 22 zeigt die mittlere Parathormonsekretion aus 16 Untersuchungseinheiten der Testgruppe 3 und der Vergleichsgruppe 3.

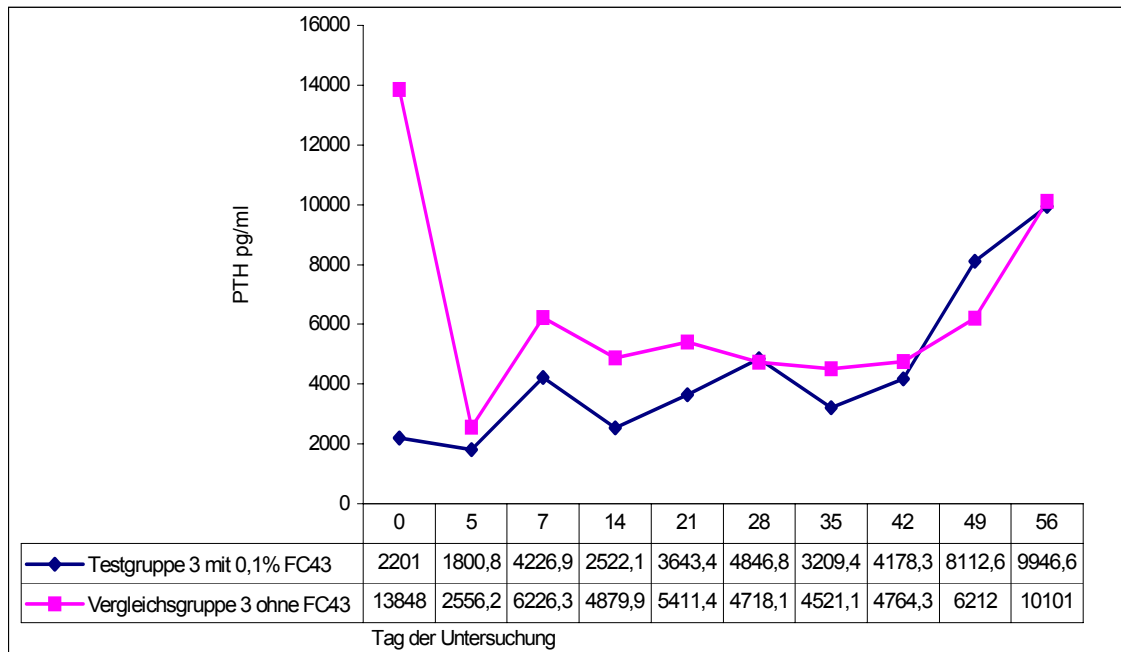


Abbildung 22: PTH-Sekretion von frischem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC 43 (Mittelwerte aus 16 Untersuchungseinheiten)

Die Werte der Parathormonsekretion der Vergleichsgruppe 3 zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Werte der Vergleichsgruppe 2 der 2. Versuchsreihe. Der Ausgangswert am Tag 1 lag auf einem hohen Niveau. Zum Tag 3 hin fiel er ab und erreichte einen zweiten Gipfel an Tag 7. Danach blieb er bis zum Tag 42 relativ konstant und stieg bis zum Tag 56 wiederum an. Die Werte der 3. Versuchsreihe lagen dabei um ein vielfaches höher als die in der 1. und 2. Versuchsreihe gemessenen Werte. Der Verlauf der Kurve aus den Mittelwerten der Testgruppe 3 ähnelte damit dem Verlauf der Mittelwerte der Vergleichsgruppe, wenn auch der Ausgangswert auf einem sehr niedrigen Niveau lag. Bis zum Tag 42 lagen die Werte meist deutlich unter den in der Vergleichsgruppe 3 gemessenen. Am Tag 42 stiegen die Werte ebenfalls an. Die Mittelwerte der Testgruppe 3 und der Vergleichsgruppe 3 unterschieden sich am Tag 56 nur noch wenig.

Der T-Test lieferte kein signifikantes Ergebnis.

Histologie

Die Abbildung 23 zeigt die Nekroseraten der Versuchsgruppen der 3. Versuchsreihe

Die Fallzahl wurde bei der Versuchsreihe 3 auf 6 Kapseln pro Untersuchungszeitraum verdreifacht.

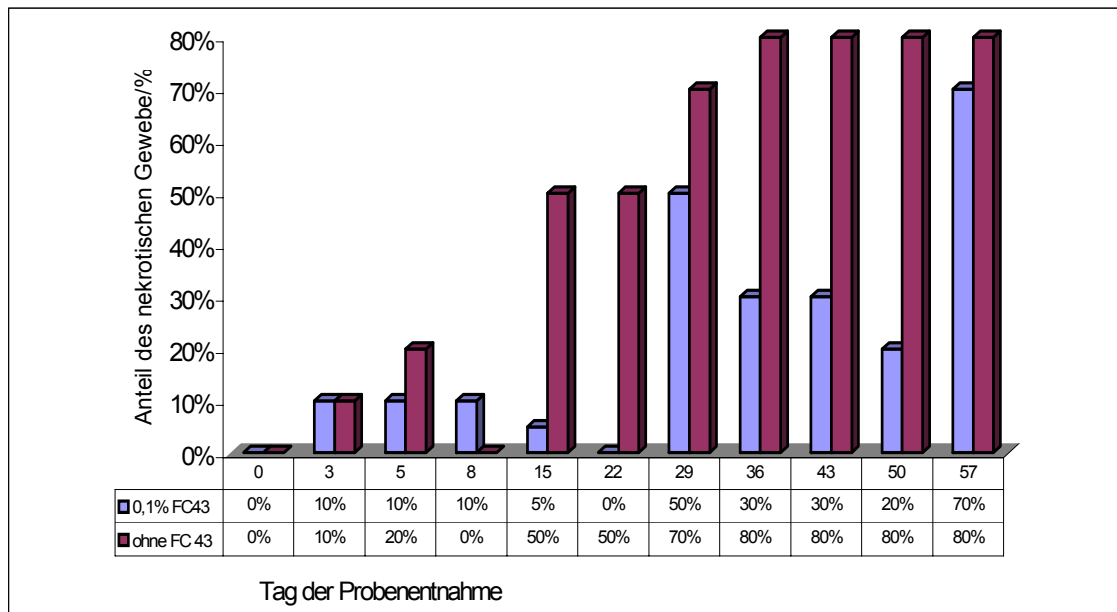


Abbildung 23: Nekroserate von frischem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe mit 0,1% FC 43 und ohne Zusatz von FC 43 (16 Untersuchungseinheiten) über den Versuchszeitraum von 8 Wochen

Bei der Testgruppe bewegte sich die Nekroserate von Tag 1 bis einschließlich Tag 22 zwischen 0% und 10%. Erst am Tag 29 erreichte sie einen Anteil von 50%. Allerdings nahm die Nekroserate im Folgenden von Tag 36 und Tag 43 wieder ab auf einen Wert von 30%, am Tag 50 betrug sie nur 20%. Am Ende der Versuchszeit, dem Tag 57 erreichte sie einen Anteil von 70%. Die Ausgangswerte der Testgruppe 3 mit 0,1% FC43 und der Vergleichsgruppe 3 ohne FC43 lagen bei 0%, d.h. das untersuchte Gewebe war vollständig vital. In der Vergleichsgruppe schwankte die Nekroserate bis einschließlich zum Tag 8 zwischen 0% und 20%. An Tag 15 und 22 stieg die Nekroserate auf 50% an, an Tag 29 erreichte sie 70% und steigerte sich bis Tag 36 auf 80%. Von Tag 36 bis zum Ende des Versuchs an Tag 57 blieb sie konstant bei 80%.

Es zeigte sich also eine Verbesserung der Nekroserate bei der Testgruppe 3 mit FC43 gegenüber der Vergleichsgruppe 3, wenn auch am Endzeitpunkt des Versuches die Werte nur um 10% differierten.



Abb.24: histologischer Schnitt einer Alginatmikro-Kapsel; HE-Färbung

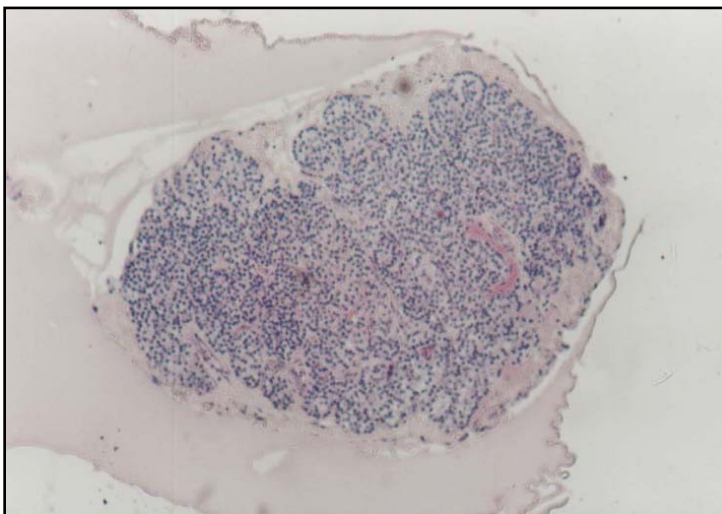


Abb. 25: histologischer Schnitt von mikro-
enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe; das
Gewebe ist vollständig vital

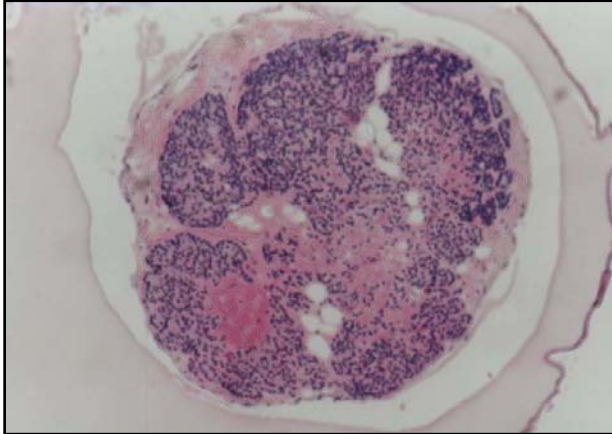


Abb. 26 : histologischer Schnitt von mikro-
enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe;
beginnende zentrale Nekrose

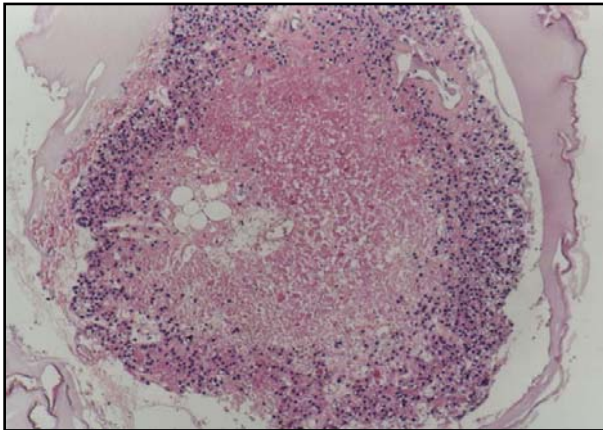


Abb. 27: histologischer Schnitt von mikro-
enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe;
fortgeschrittene Nekrose (ca.50%)

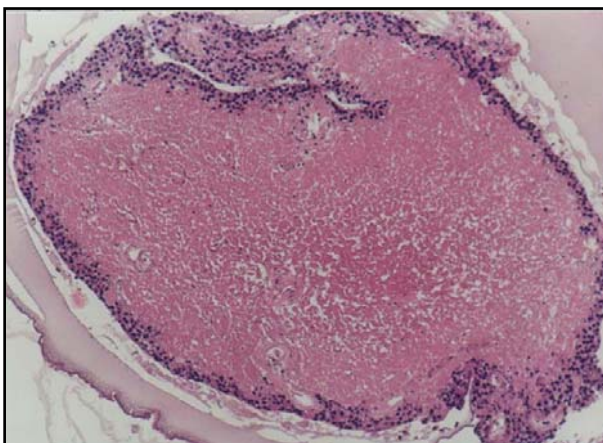


Abb. 28: histologischer Schnitt von mikro-
enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe;
ausgedehnte zentrale Nekrose von 90%

5. Diskussion

Die Mikroenkapsulierung stellt ein Verfahren dar, eine immunologische Erkennung eines allogenen Transplantates zu verhindern. Damit kann die Allotransplantation von endokrinem Gewebe ermöglicht werden. Mittels einer biokompatiblen Membran wird eine Isolation des Spendergewebes vom Immunsystem des Empfängers erreicht. Trotz dieser Matrix ist eine Ernährung des Gewebes per diffusionem und eine Produktion von Hormonen, welche ebenfalls durch die Membran diffundieren können, möglich. Eine Alloantigenerkennung ist durch diese Membran nicht möglich, da weder Spenderzellen aus noch immunkompetente Empfängerzellen in das verkapselte Gewebe eindringen können. Auch für xenoreaktive Antikörper ist aufgrund ihres hohen Molekulargewicht die Barriere der Alginatmembran unüberwindbar. Bei allen bisherigen Versuchen einer allogenen oder xenogenen Transplantation nach der Mikroenkapsulierung stellt sich über kurz oder lang ein Transplantatversagen ein. Die Ursache dafür wird in einer entzündlichen fibrotischen Reaktion um die Mikrokapseln herum, dem sogenannten perikapsulären Infiltrat gesehen. Schrezenmeier et al. hatten 1994 nach Messungen des Sauerstoffpartialdruckes im Zentrum von verkapselten Inselorganen eine chronische Sauerstoffunterversorgung des Kapselinhaltes als möglichen Schädigungsmechanismus des Gewebes und damit Ursache für ein späteres Transplantatversagen mitverantwortlich gemacht, daneben ist noch eine chronische nutritive Unterversorgung in Verbindung mit einer Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten zu nennen (Darquy et al., 1990).

Die Grundlage zur Forschung an den Perfluorokarbonen legten 1966 und Gollan mit ihrer Entdeckung, dass Sauerstoff in Perfluorokarbonlösungen doppelt so löslich ist wie in Blut. Daraus entstanden vielfältige Ideen zur klinischen Anwendung der Perfluorokarbonate: in der Pharmakologie, zur Perfusion von Organen vor der Transplantation (Scheule et al. 1997; Ohya et al. 1995), als Zusatz bei Bestrahlung von Tumoren und zur Therapie des Schock (Faithfull, 1987). Besonders das Perfluorokarbonsgemisch Fluosol-DA kann bei der Ballondilatation von Herzkranzgefäßen (PTCA) myokardiale

Ischämien vermindern und die Ventrikelfunktion nach Herzinfarkt verbessern (Kent et al.1990, Forman et al. 1991,Cleman et al.1986). Allerdings werden nach dem klinischen Einsatz anaphylaktische Reaktionen, wie hypotone Blutdruckkrisen und das ARDS (Schocklunge) bei Menschen beobachtet (Police et al 1985, Tremper et al. 1984, Lustig et al. 1989). Dabei kommt es zur Komplementaktivierung (Hong et al.1991). Zusätzlich gibt es Anzeichen dafür, dass die Perfluorokarbone im Körper toxisch reagieren, da sie vom retikuloendothelialen System phagozytiert werden und darin persistieren (Whitman et al, 1989). Trotzdem ergibt sich aus den beobachteten Effekten bei der systemischen Anwendung von Perfluorokarbonsgemischen als künstliche Blutersatzstoffe der weitere Forschungsansatz, die immunsuppressive Komponente zur Prophylaxe der hyperakuten oder chronischen Transplantatabstoßung bei Organtransplantationen auszunutzen (Wada et al., 1995(1); Tanaka et al. 1999). Dabei scheint gerade die Komplementaktivierung durch die Perfluorokarbonlösung den entscheidenden Vorteil auszumachen. Es kommt zu einem Verbrauch der Komplementfaktoren im Spenderorgan vor der Transplantation und somit kann während bzw. direkt nach der Transplantation keine Komplementkaskade mehr ausgelöst werden, da die Faktoren in ihrer Aktivität um mehr als 50% reduziert sind (Wada et al. 1995(2)).

Auch der Zusatz von Perfluorokarbonlösungen zu Zellkulturen, z.B. von Pankreasinzellzellen (Zerkorn et al., 1991), wird erforscht. Es kann eine bessere Sauerstoffversorgung der kultivierten Zellen gemessen an der Funktion (Menge des sezernierten Insulin) erreicht werden. Gleichzeitig zeigt sich, dass keine Unterschiede bei der Zugabe von Konzentrationen von FC43-Lösung zwischen 5% und 40% zu beobachten waren, dass also schon maximale Effekte mit geringen Mengen an Perfluorokarbon erzielt werden können.

In dieser Studie wird das Perfluorokarbon FC 43 erstmalig in Alginat gelöst, um eine bessere Sauerstoffversorgung von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe zu erreichen. Dabei ist eine Immunsuppression als Nebeneffekt ebenso erwünscht, wie ein vermuteter Stabilisierungseffekt der inkorporierten Moleküle auf die semipermeable Alginatmembran. Dabei soll diese Studie die technischen Grundlagen für eine spätere Erprobung des

Konzeptes im Tierversuch liefern. Es werden das für die Oberflächenstabilität optimale Mischungsverhältnis von Alginat und FC 43 bei maximaler Verbesserung der Sauerstoffversorgung ermittelt. Da die Stabilität und die Oberflächenbeschaffenheit der Kapseln limitierende Faktoren der Transplantatfunktion darstellen, muss die Konzentration des FC 43 so gewählt werden, dass seine Effekte optimal ausgenutzt und dabei die Kapselstabilität nicht beeinträchtigt werden. Ein zusätzliches wesentliches Problem in bisherigen Versuchen stellt das Aufquellen der Kapseln dar, da dadurch mechanische Stabilität und Oberflächenintegrität beeinträchtigt werden. Es kommt durch einen kolloidosmotischen Gradienten zustande, der durch an die Polymere gebundenes Wasser und Ionen verursacht ist. Ein Lösungsansatz dieses Problems verfolgt die Verhinderung des Aufquellen durch Inkorporierung von Serumproteinen während der Gelbildung (Zimmermann et al., 2000) und das sofortige Entfernen überschüssiger Ba^{2+} -Ionen aus dem Gel nach dessen Bildung durch 30 minütige Inkubation in 6mM Natriumsulfat-Lösung (Hillgärtner, 1999). Anstelle von Serumproteinen können auch Perfluorokarbone während der Gelbildung inkorporiert werden. Sie zeigen denselben Effekt auf das Aufquellen der Kapseln wie die Proteine und verbessern damit die Langzeitstabilität der Kapseln. Des Weiteren erhöhen Perfluorokarbone den Sauerstoffpartialdruck in den Mikrokapseln (Zimmermann et al., 2000). Sie sind bekannt für ihre hohe Sauerstoffbindungskapazität und erhöhen den Sauerstofftransport zu den Zellen (Chang, 1993; Armiger, 1992; Junker et al., 1990).

Das Problem der Fibrosierung der Kapsel nach einer bestimmten Zeit kommt durch die Adhäsion und Migration von Immunzellen auf der Oberfläche zustande. Dabei dienen zur Adhäsion Strukturunregelmäßigkeiten. Geisen et al. machten für die Entstehung des Infiltrats die Entstehung von Kristallen verantwortlich, eine Phagozytose der Kapsel konnte elektroenemikroskopisch bewiesen werden (Geisen et al., 1990). Es wird aber besonders eine Oberflächenunregelmäßigkeit bei einer Kapsel, die aus einem Alginat-Perfluorokarbon-Gemisch besteht, beschrieben (Zimmermann et al., 2000). Das wirft die Frage auf, ob Perfluorokarbone zu Strukturunregelmäßigkeiten führen und damit die Adhäsion von Immunzellen verstärken, statt sie zu

supprimieren. Auch in diesem Versuch wird bei Inkorporation von 1% oder mehr FC 43 im Alginat eine unregelmäßige Oberfläche beobachtet, die zu einem verminderten Stabilitätsverhalten der Kapseln in vitro führt. Allerdings werden in der Studie von Zimmermann Alginatkapseln ohne FC 43 nach einer in vivo Transplantationszeit von 4 Wochen mit einer Perfluorokarbon-Alginat-Kapsel mit einer in vivo Transplantationszeit von 15 Monaten verglichen, so dass ein Vergleich eigentlich nicht zulässig erscheint. Trotzdem scheint entweder kein immunsuppressiver Effekt eingetreten zu sein oder dieser führt nicht zu einem vollständigen Schutz vor Adhäsion.

Die erste Versuchsreihe dient der Erprobung der optimalen Konzentration von FC 43 als Zusatz zum Alginat. Das Ergebnis liegt bei einer Konzentration von 0,1% FC 43 bezogen auf die jeweilige Alginatmenge. Die Ergebnisse der Testgruppe 1b sind im Vergleich mit den anderen Testgruppen 1 bezüglich aller untersuchten Kriterien (Stabilität und Integrität der Kapsel; Funktion und Nekroserate des mikroenkapsulierten Gewebe) herausragend. Zur Vergleichsgruppe 1 verhält sich die Testgruppe 1b in Stabilität und Integrität annähernd gleich bzw. besser und die statistische Auswertung der Funktion ergibt bei einem $\alpha = 0,05$ eine signifikante Verbesserung. Auch bezüglich der Vitalität ist die Testgruppe 1 allen anderen Versuchsgruppen 1 überlegen. Allerdings erlaubt es der kurze Versuchszeitraum von 22 Tagen nicht, bereits aus diesem Versuch eine sichere Aussage abzuleiten. Anhand des Ergebnisses der zweiten Versuchsreihe über einen Versuchszeitraum von 60 Tagen wird das Ergebnis der ersten Versuchsreihe nicht nur bestätigt, sondern die Unterschiede werden auch deutlicher. Bei ungefähr gleich guter Stabilität zeigen sich eine wesentlich bessere Kapselintegrität, Funktion und Vitalität des Gewebes, das mit Zusatz von FC 43 mikroenkapsuliert wird. Das FC 43 scheint also einen stabilisierenden Einfluss auf das Alginat auszuüben und verbessert deutlich die Funktion des Gewebes gemessen an der Parathormonsekretion. Auch die Vitalität des Gewebes ist deutlich erhöht, so dass man von einer besseren Sauerstoffversorgung der Zellen ausgehen kann, da dies als wesentlich limitierender Faktor der Lebenszeit von mikroenkapsulierten Zellen bezeichnet werden kann.

Ein weiterer Aspekt dieser Studie ist der Einsatz von kryokonserviertem Gewebe im Vergleich zu frischem Gewebe. Dazu dient die Versuchsreihe 3 mit einer Vergleichsgruppe mit frischem mikroenkapsuliertem Gewebe ohne FC 43 und einer Testgruppe 3 mit frischem mikroenkapsuliertem Gewebe und 0,1% FC43. Dabei fällt auf, dass zwar die Vitalität des Gewebes und die Stabilität der Kapseln der Testgruppe den Ergebnissen der Vergleichsgruppe wesentlich überlegen sind, aber für die Funktion gemessen an der Parathormonsekretion kein signifikanter Unterschied feststellbar ist, so dass für diese Gruppe eine Kapselverbesserung durch FC 43 nicht statistisch erwiesen ist. Auch in der 8. Woche zum Endzeitpunkt des Versuchs liegen die Mengen an sezerniertem Parathormon mit Werten um 10000 pg/ml sehr hoch. Die Transplantatfunktion kann damit für beide Gruppen als hervorragend bezeichnet werden. Das ist auf den Einsatz von frischem Gewebe

zurückzuführen. Die Vermutung liegt nahe, dass eine statistisch messbare Transplantatverbesserung durch FC 43 erst bei bereits eingeschränkter Funktion des Gewebes durch eine verminderte Vitalität z.B. nach Kryokonservierung zu verzeichnen ist. Dies würde bedeuten, dass frisches Gewebe insgesamt über einen längeren Versuchszeitraum beobachtet werden müsste, um die Verbesserung der Transplantate mit FC 43 nicht nur beobachten, sondern auch statistisch durch signifikante Unterschiede in der Parathormonsekretion messen zu können. Scheinbar setzt der Effekt der verbesserten Sauerstoffversorgung durch das FC 43 bezogen auf die Funktion erst ein, wenn das Gewebe histologisch bereits deutlich vorgeschädigt ist. Es zeigt sich bei beiden Versuchsgruppen 3 über den gesamten Versuchszeitraum eine wesentlich höhere Gewebefunktion, das heißt eine höhere Parathormonsekretion, als in den Versuchsgruppen 2 oder 1, desgleichen eine deutlich bessere Vitalität. Deshalb sollte für eine Mikroenkapsulierung zur Transplantation in vivo auf jeden Fall bevorzugt frisches Gewebe verwendet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Antwort auf die Frage zu finden, ob FC 43 zur Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe in Alginate geeignet ist, ob es einen günstigen Effekt auf die Sauerstoffversorgung der Kapseln hat und in welcher Form und welcher Konzentration es dem Alginate hinzuzufügen ist. Es

kann gezeigt werden, dass eine Konzentration von 0,1% FC 43 als Zusatz zu dem Alginat vor der Mikroenkapsulierung die Stabilität der Kapseln verbessern und die Nekroserate verkleinern kann. Zusätzlich kann die Funktion des Gewebes signifikant verbessert werden. Auf diese Studie sollte eine Erprobung der Anwendung von FC 43 bzw. eine Überprüfung der Ergebnisse im Tierversuch folgen.

6. Zusammenfassung

Zur Behandlung des Hypoparathyreoidismus existiert neben der medikamentösen Therapie die Möglichkeit der allogene Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe ohne Immunsuppression. Da lebensbedrohliche Komplikationen des Hypoparathyreoidismus selten sind, ist eine systemische Immunsuppression post transplantationem nicht gerechtfertigt. Um eine Transplantatabstossung zu verhindern wird eine Immunisolation des transplantierten Gewebes mit einer semipermeablen Biomembran erforscht, die Mikroenkapsulierung mit Alginaten. Von besonderer Bedeutung für die Transplantation des Nebenschilddrüsengewebes sind eine ausreichende nutritive Versorgung des enkapsulierten Gewebes und die Stabilität der Alginatkapsel. Vorausgehende Studien zeigen wiederholt eine zentrale Nekrose des enkapsulierten Gewebes, vermutlich durch eine zu geringe Sauerstoffkonzentration in den zentralen Gewebeanteilen (Hasse et al., 1997). Sauerstoff ist in Perfluorokarbonen doppelt so löslich wie in Blut (Clark, Gollan, 1966). Deshalb war es Ziel dieser Studie zu prüfen, ob und in welcher Form die Stabilität der Kapseln und die Sauerstoffversorgung des Gewebes durch Zusatz des Perfluorokarbon FC 43 zu dem Alginat in vitro verbessert werden können.

Dazu wurden 3 aufeinander aufbauende Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe dieser Studie wurde in einem Versuchszeitraum von 22 Tagen eine optimale Konzentration für das FC 43 als Zusatz zu dem Alginat vor der Mikroenkapsulierung erprobt. Als optimale Konzentration wurde dabei die Zugabe von 0,1% FC 43 ermittelt, die zu einer signifikanten Verbesserung ($\alpha=0,05$) der Transplantatfunktion gemessen an der Parathormonsekretion führt.

Die zweite Versuchsreihe verfolgte dieses Ergebnis über einen längeren Versuchszeitraum von 60 Tagen. Anhand des Ergebnis dieser 2. Versuchsreihe wurde das Ergebnis einer optimalen Konzentration von 0,1% FC 43 als Zugabe zu dem Alginat nicht nur bestätigt, sondern die Unterschiede traten auch deutlicher hervor. Bei ungefähr gleich guter Stabilität zeigten sich eine wesentlich bessere Kapselintegrität, Funktion und Vitalität des Gewebes, das mit Zusatz von FC 43 mikroenkapsuliert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass FC 43 die Alginatkapsel stabilisierte und die Funktion

des Gewebes gemessen an der Parathormonsekretion verbesserte. Auch die Nekroserate des Gewebes war deutlich erniedrigt. Dies ließ auf eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen schließen, da dies als wesentlich limitierender Faktor der Lebenszeit von mikroenkapsulierten Zellen bezeichnet werden kann. In der 1. und 2. Versuchsreihe wurde kryokonserviertes Nebenschilddrüsengewebe desselben Patienten verwendet.

Mit der 3. Versuchsreihe wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Dazu wurde Nebenschilddrüsengewebe eines anderen Patienten direkt nach der Entnahme, also ohne Kryokonservierung, verarbeitet.

Für die Perfluorokarbonate können in vivo sowohl immunsuppressive Effekte (Wada et al. 1995(1); Tanaka et al. 1999) durch Komplementaktivierung (Hong et al. 1991) und Hemmung von zufälliger Migration, Chemotaxis und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten (Lane et al., 1984), als auch toxische Effekte durch Phagozytose und Persistieren im retikuloendothelialen System (Whitman et al. 1989) nachgewiesen werden.

Ein Zusatz von FC 43 zu einem mikroenkapsuliertem Transplantat sollte also möglichst so gewählt sein, dass von zusätzlichen immunsuppressiven Effekten profitiert werden kann ohne toxische Nebenwirkungen zu riskieren.

Strukturunregelmäßigkeiten der Kapseloberfläche dienen Immunzellen zur Adhäsion und führen im Folgenden zur Fibrosierung der Kapsel und damit zum Transplantatversagen (Zimmermann et al., 2000). Gerade der Zusatz von Perfluorokarbonen kann aber zu Oberflächenunregelmäßigkeiten führen, wie es auch in dieser Studie beobachtet werden konnte. Deshalb muss der Zusatz des FC 43 optimal gewählt werden, um noch eine maximal optimierte Sauerstoffversorgung bei minimaler Gefährdung der Oberflächenintegrität zu gewährleisten.

Zur Weiterverfolgung unseres Forschungsansatzes bietet sich eine Erprobung der ermittelten Ergebnisse in einer in vivo Studie, am Tiermodell an. Dabei müssten die Ergebnisse verifiziert und vor allem eine mögliche Toxizität sicher ausgeschlossen werden.

Sollte der positive Effekt dieser Studie sich in vivo bestätigen, könnte der Einsatz von FC 43 zur Herstellung von klinischen Allotransplantaten der Nebenschilddrüse zur Behandlung des Hypoparathyreoidismus beim

Menschen Anwendung finden und zu einem verbesserten Transplantationserfolg führen.

7. Anhang

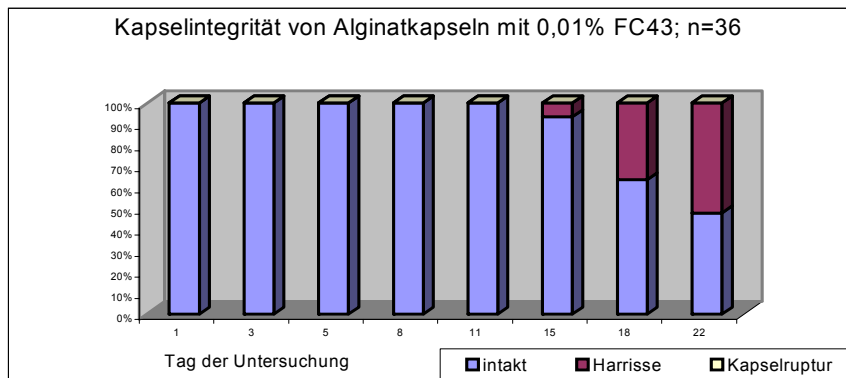


Abb. A1: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zusatz von 0,01% FC 43; 18 Untersuchungseinheiten; Testgruppe 1a

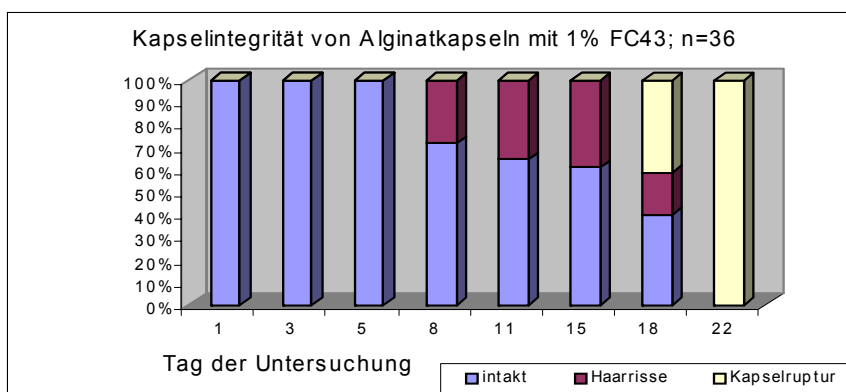


Abb. A2: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zusatz von 1% FC 43; 18 Untersuchungseinheiten; Testgruppe 1c

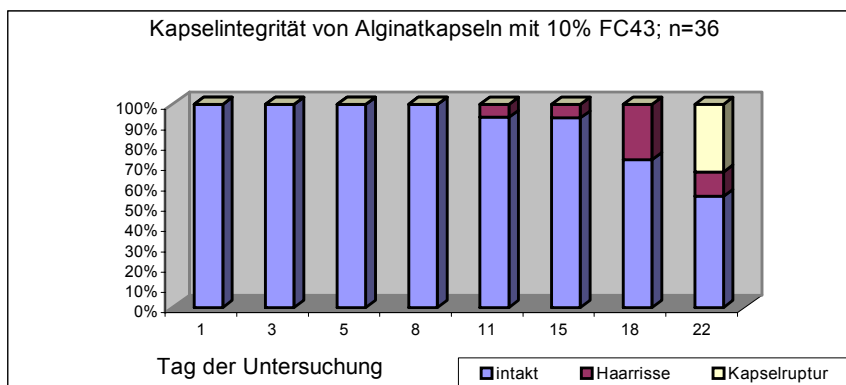


Abb. A3: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zusatz von 10% FC 43; 18 Untersuchungseinheiten; Testgruppe 1d

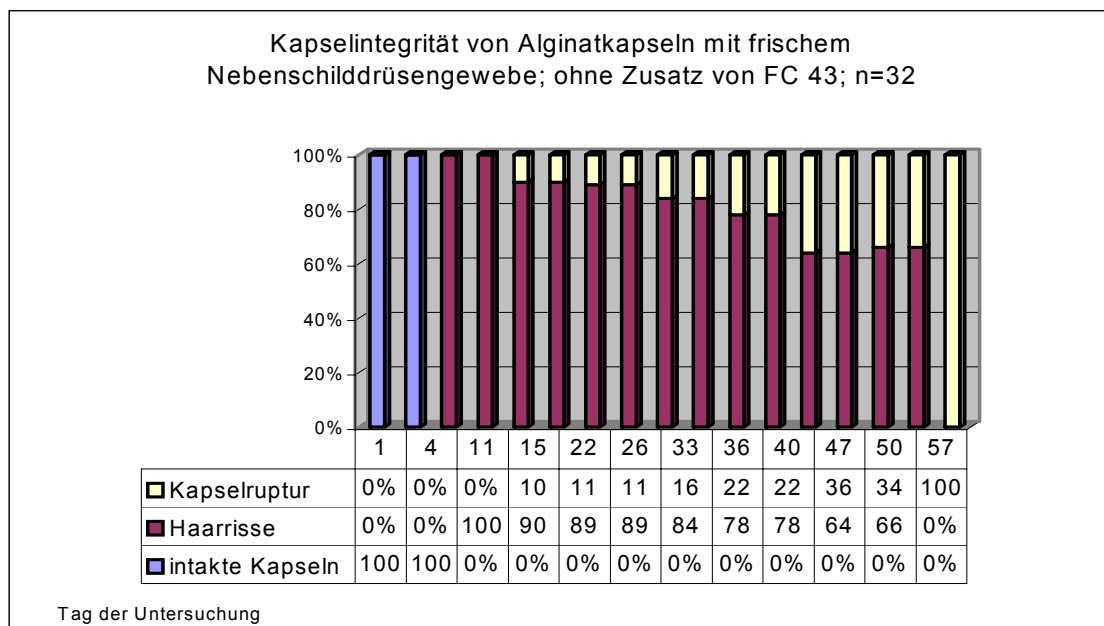


Abb. A4: Kapselintegrität von Alginatkapseln mit frischem mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43; 16 Untersuchungseinheiten Vergleichsgruppe 3

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1(S.8): Funktionsprinzip der Alginatkapsel. Aus: Hillgärtner, M., Zimmermann, H., Mimietz, S., Jork, A., Thürmer, F., Schneider, H., Hasse, C., Haase, A., Fuhr, G., Rothmund, M., Zimmermann, U.: Immunoisolation of transplants by entrapment in ¹⁹F-labelled alginate gels: production, biocompatibility, stability and long term monitoring of functional integrity. Mat. wiss. U. Werkstofftech. 1999, 30: 1-10

Abbildung 2 (S.11): Das „egg-box-model“ nach Grant: eigene Abbildung

Abbildung 3 (S.13): Strukturformel des Perfluorotributylamin (FC 43); aus: NIST, ChemistryWebBook, 2000

Abbildung 4 (S.16): Dreistoff- Düse: eigene Abbildung;

Abbildung 5 (S.27): Quellverhalten der Vergleichsgruppe 1 ohne FC 43; Darstellung von 18 Untersuchungseinheiten

Abbildung 6 (S.27): Quellverhalten von Alginatkapseln ohne FC 43 und mit Zusatz von 0,01; 0,1; 1; 10 % FC 43; Mittelwerte aus jeweils 36 Mikrokapseln pro Versuchsgruppe

Abbildung 7 (S.30): Kapselintegrität von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 und mit Zusatz von 0,01; 0,1; 1; 10 % FC 43; 18 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe

Abbildung 8 (S.30): Kapselintegrität, Testgruppe 1b (Alginatkapseln mit Zusatz von 0,1% FC 43; 18 UE)

Abbildung 9 (S.31): Kapselintegrität, Vergleichsgruppe 1 (Alginatkapseln ohne FC 43; 18 Untersuchungseinheiten)

Abbildung 10 (S.32): PTH-Sekretion von mikroenkapsuliertem kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43; Mittelwert von 18 Untersuchungseinheiten

Abbildung 11 (S.33): PTH-Sekretion von mikroenkapsuliertem kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe ohne FC 43 und mit Zugabe

von 0,01; 0,1; 1; 10% FC 43 (Mittelwerte aus 18 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Abbildung 12 (S.34): Nekroserate von kryokonserviertem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe mit 0,01;0,1; 1;10 % FC43 und ohne Zusatz von FC43; Darstellung des Anteils des nekrotischen Gewebes in Prozent (18 Untersuchungseinheiten am Tag 22)

Abbildung 13 (S.35): Quellverhalten von Alginatkapseln ohne, und mit Zusatz von 0,1% FC43 (11 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Abbildung 14 (S.36): Kapselintegrität von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC43 (11 Untersuchungseinheiten)

Abbildung 15 (S.37): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit 0,1% FC 43 (11 UE)

Abbildung 16 (S.38): Kapselintegrität von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 (18 Untersuchungseinheiten)

Abbildung 17 (S.39): PTH-Sekretion von kryokonserviertem nativen und mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsengewebe mit 0,1% FC43 und ohne Zusatz von FC 43 (Mittelwerte aus 11Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Abbildung 18 (S.41): Nekroserate von kryokonserviertem nativen und mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC 43; Anteil des nekrotischen Gewebes von 11 Untersuchungseinheiten in Prozent; Darstellung der Werte für die 8. Versuchswoche

Abbildung 19 (S.42): Quellverhalten von Alginatkapseln mit 0,1% FC43 und ohne Zusatz von FC 43; frisches Gewebe (Mittelwerte aus 16 Untersuchungseinheiten)

Abbildung 20 (S.43): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit 0,1% FC43 und ohne Zusatz von FC 43; frisches Gewebe (16 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe)

Abbildung 21 (S.44): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zugabe von 0,1% FC 43; frisches Gewebe (16 Untersuchungseinheiten)

Abbildung 22 (S.45): PTH-Sekretion von frischem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC 43 (Mittelwerte aus 16 Untersuchungseinheiten)

Abbildung 23 (S.46): Nekroserate von frischem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe mit 0,1% FC 43 und ohne Zusatz von FC 43 (16 Untersuchungseinheiten) über den Versuchszeitraum von 8 Wochen

Abbildung 24 (S.47): histologischer Schnitt einer Alginatmikrokapsel; HE-Färbung

Abbildung 25 (S.47): histologischer Schnitt von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe; das Gewebe ist vollständig vital

Abbildung 26 (S.48): histologischer Schnitt von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe; beginnende zentrale Nekrose

Abbildung 27 (S.48): histologischer Schnitt von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe; fortgeschrittene Nekrose (ca.50%)

Abbildung 28 (S.48): histologischer Schnitt von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe; ausgedehnte zentrale Nekrose von 90%

Abb. A1(S.57): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zusatz von 0,01% FC 43; 18 Untersuchungseinheiten; Testgruppe 1a

Abb. A2 (S.57): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zusatz von 1% FC 43; 18 Untersuchungseinheiten; Testgruppe 1c

Abb. A3 (S.57): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit Zusatz von 10% FC 43; 18 Untersuchungseinheiten; Testgruppe 1d

Abb. A4 (S.58): Kapselintegrität von Alginatkapseln mit frischem mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe ohne Zusatz von FC 43; 16 Untersuchungseinheiten
Vergleichsgruppe 3

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 (S.28): Quellverhalten der 1. Versuchsreihe; Darstellung der Kapselgröße als Durchmesser; Angabe der Aufquellung als Mittelwert +/- Standardabweichung und in Prozent bezogen auf die Ausgangsgröße

Tabelle 2 (S.35): Quellverhalten von Alginatkapseln ohne Zusatz von FC 43 und mit 0,1% FC 43; 11 Untersuchungseinheiten pro Versuchsgruppe; Darstellung der Kapselgröße als Durchmesser; Angabe als Mittelwert +/- Standardabweichung und in Prozent bezogen auf die Ausgangsgröße

Tabelle 3 (S.42): Quellverhalten der Versuchsgruppen der 3. Versuchsreihe; Darstellung der Kapselgröße als Durchmesser; Angabe als Mittelwert +/- Standardabweichung und in Prozent der Ausgangsgröße; 16 Untersuchungseinheiten

10. Literatur

Armiger, W.B., Ju, L.-K.: Use of perfluorocarbon emulsions in cell culture. *BioTechniques* 1992, 12: 258-263

Bach, F.H., Bach, M.L., Sondel, P.M.: MHC antigens: differential function in T lymphocyte activation. *Nature* 1976, 259: 273

Bach, F.H.: Comment on "Immunogenicity of foreign tissues". *Transplantation* 1980, 29: 182,

Chang, T.M.S.: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993

Clark Jr., L. C., Gollan, F.: Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 1966, 152: 1755-1756

Cleman, M., Jaffe, C.C., Wohlgelernter, D.: Prevention of ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty by transcatheter infusion of oxygenated Fluosol-DA 20%. *Circulation* 1986, 74: 555-62

Darquy, S.; Cicheportiche, D.; Capron, F.; Boitard, C.; Reach, G.: Comparative study of microencapsulated rat islets implanted in different models in mice. *Horm. Metabol. Res.* 1990, 35(Suppl.25):213-214

Demeester-Mirkine, N., Hooghe, L., Van Geertruyden, J., De Maertelaer, J.: Hypocalcaemia after thyroidectomy. *Arch. Surg.* 1992, 127: 854-862

Faithfull, NS.: Fluorocarbons: current status and future applications. *Anaesthesia* 1987, 42:234-42

Forman, M.B., Perry, J.M., Wilson, B.H.: Demonstration of myocardial reperfusion injury in man: results of a pilot study utilizing acute angioplasty with

perfluorochemical in anterior myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1991, 18: 911-18

Gann, D.S., Paone, J.F.: Delayed hypocalcaemia after thyroidectomy or Graves`disease is prevented by parathyroid autotransplantation. Ann. Surg. 1979, 190: 508-513

Geisen, K.; Deutschländer, H.; Gorbach, S., Klenke, C.; Zimmermann, U.: Function of barium alginate microencapsulated xenogenic islets in different diabetic mouse models. In: Shafir, E. ed.: Frontiers in diabetes research. Lessons from animal diabetes III. John Libbey London 1990:142-159

Gough, I.R., Finnimore, M.: Rat parathyroid transplantation: allograft pre-treatment with organ culture and antilymphocyte serum. Transplantation 1980, 29:149

Gough, I.R., Finnimore, M.: Transplantation of organ cultured rat parathyroids. Aust. N.Z. J. Surg. 1979, 49:716

Grant, G.T. et al. : Biological interactions between polysaccharides and divalent cations : the egg-box-model. FEBS Letters, 32:195-198

Harris,, S.C.: Thyroid and parathyroid surgical complications. Am. J. Surg. 1992, 163: 476-488

Hasse, C., Klöck, G., Schlosser, A., Zimmermann, U., Rothmund, M.: Parathyroid transplantation without immunosuppression. The Lancet 1997, 350:1296-1297

Hasse, C., Klöck, G., Zielke, A., Schlosser, A., Barth, P., Zimmermann, U., Rothmund, M.: Transplantation of parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: in vitro and in vivo function of parathyroid tissue microencapsulated with a novel amitogenic alginate. Int. J. Artif. Organs 1996, 19 :735

Hasse, C., Schrezenmaier, J., Stinner, B., Rothmund, M.: Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroid in rats. *World J. Surg.* 1994 (1), 18:630-634

Hasse, C., Schrezenmaier, J., Stinner, B., Rothmund, M.: Successful Xenotransplantation of microencapsulated parathyroid tissue: Evidence of long term function without immunosuppression in animal experiment. *Langenbecks Arch. Chir.* 1994 (2), *Chir. Forum' 94 f. exp. u. klin. Forsch.*, 209-214

Hasse, C., Stinner, B., Wagner, P.K., Rothmund, M.: Allotransplantation of parathyroid glands in rats: long-term in vivo function without immunosuppression. *Langenbecks Arch. Chir.* 1991, 14:69

Hasse, C., Zielke, A., Klöck, G., Schlosser, A., Barth, P., Zimmermann, U., Sitter, H., Lorenz, W., Rothmund, M.: Amitogenic Alginates: Key to first clinical application of microencapsulation technology. *World J. Surg.* 1998, 22:659-665

Hillgärtner, M., Zimmermann, H., Mimietz, S., Jork, A., Thürmer, F., Schneider, H., Hasse, C., Haase, A., Fuhr, G., Rothmund, M., Zimmermann, U.: Immunoisolation of transplants by entrapment in ¹⁹F-labelled alginate gels: production, biocompatibility, stability and long term monitoring of functional integrity. *Mat. wiss. U. Werkstofftech.* 1999, 30: 1-10

Hong, F., Shastri, K.A., Logue, G.L. Spaulding, M.B.: Complement activation by artificial blood substitute Fluosol: in vitro and in vivo studies. *Transfusion* 1991, 31:642-47

Inverardi, L., Fraker, C., Mares-guia, M., Ricordi, C.: Islet cell encapsulation with a new copolymer and perfluorohydrocarbons. *Cell Transplantation* 1999, 8: 176

Jork, A., Thürmer, F., Cramer, H., Zimmermann, G., Gessner, P., Hämel, K., Hofmann, G., Kuttler, B., Hahn, H.-J., Josimovic-Alasevic, O., Fritsch, K.-G., Zimmermann, U.: Biocompatible alginate from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation. Appl . Microbiol. Biotechnol 2000, 53:224-229

Junker, B.H., Wang, D.I.C., Hatton, T.A.: Oxygen transferenhancement in aqueous/ perfluorocarbon fermentation systems: 2nd theoretical analysis. Biotechnol. Bioengin. 1990, 35: 586-597

Kent, K.M., Cleman, M.W., Cowley, M.J.: Reduction of myocardial ischemia during percutaneous coronary angioplasty with oxygenated Fluosol. Am J Cardiol 1990, 66: 279-84

Klöck, G., Frank, H., Houben, R., Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Wöhrle, M., Federlin, K., Zimmermann, U.: Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40:638

Kukreja, S.C., Johnson, P.A., Ayala, G., Bowser, E.N., Williams, G.N.:Allotransplantation of rat parathyroid glands: effects of organ culture and transplantation into the adrenal gland. Experientia 1979, 35:559

Lafferty, K.J: Immunogenicity of foreign tissues. Transplantation 1980, 29: 179

Lustig, R., McIntosh-Lowe, N., Rose, C.: Phase 1/2 study of fluosol-DA and 100% oxygen as an adjuvant to radiation in the treatment of advanced squamos cell tumors of the head and neck. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989, 16:1587-93

Lutz, L., Kettermann, M., Racz, I., Nöth, U.: Several methods utilized for the assessment of biocompatibility af perfluorochemicals. Art. Cells, Blood Subst. & Immob. Biotech. 1995, 23: 407-415

Naji, A., Silvers, W.K., Barker, C.F.: Effects of culture in 95% O₂ on the survival of parathyroid allografts. Surg. Forum 1979, 30:109

Neufield, R. B., Maclaren, N., Blizzard, R.: Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune syndromes. Medicine (Baltimore) 1981, 60:355

Ohya, T., Ohwada, S., Kawashima, Y.: The effect of hypothermic perfusion with oxygenated perfluorochemical during in situ extended hepatectomy of canine liver. Journal of the American College of Surgeons 1996, 182: 219-225

Okano, K. et al.: Comparative efficiency of various vitamin D metabolites in the treatment of various types of hypoparathyroidism. J.clin.Endocr. 1982, 55:238

Police, A.M., Waxman, K., Tominaga, G.: Pulmonary complications after Fluosol administration to patients with lifethreatening blood loss. Crit Care Med 1985,13:96-98

Raaf, J.H., Farr, H.W., Laird Meyers, W.P., Good, R.A.: Transplantation of fresh and cultured parathyroid glands in the rat. AM. J. Surg. 1977, 128:478

Salvesen, H., Njolstad, P.R., Akslen, L.A., Albrektsen, G., Viste, A., Soreide, O., Varhaug, J.E.: Thyroid carcinoma: results from surgical treatment in 211 consecutive patients. Eur. J. of surgery 1991, 157: 493-502

Scheule, A.M., Bohl, A., Heinemann, M.K., Ziemer, G., Henze, E.: Postischemic synthesis of high energy phosphates in isolated porcine hearts during reperfusion with 11 or 25°C hypothermic perfluorocarbon emulsion FC 43. A ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 1997, 11:746-50

Schrezenmeir, J.; Kirchgessner, J.; Gerö, L.;Kunz,L.; Beyer, J.: Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islet organs, Transplantation 1994,57;9: 1308-1314

Shukla, H.P., Mason, R.P., Bansal, N., Antich, P.P.: Regional myocardial oxygen tension: ^{19}F MRI of sequestered Perfluorocarbon. *Magn. Reson. Med.* 1996, 35 : 827-833

Skjåk-Bræk, G. : Alginates : biosynthesis and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochemical Society Transactions* 1992, 20: 27-33

Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G.: Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 1990, 8: 71-78

Sollinger, H.W., Mack, E., Cook, K., Belzer, F.O.: Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation* 1983, 36:599-602

Starling, J.R., Fidler, R., Corry, R.J.: Prolongation of survival of rat parathyroid allografts by enhancing serum and tissue culture. *Surgery* 1997, 81:668

Tanaka, M., Tamaki, T., Konoeda, Y., Kawamura, A., Takahashi, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T.: impaired Recoloration of a discordant liver xenograft in the Guinea pig-to-rat combination. *Transplantation* 1999, 68(2):304-307

Thomas, S. R., Gradon, L., Pratsinis, S. E., Pratt, R. G., Fotou, G.P., McGoron, A. J., Podgorski, A.L., Millard, R.W. : Perfluorocarbon compound aerosols for delivery to the lung as potential ^{19}F magnetic resonance reporters of regional pulmonary pO_2 . *Invest. Radiol.* 1997, 32: 29-38

Tremper, K.K., Vercelotti, G.M., Hammerschmidt, D.E.: Hemodynamic profile of adverse clinical reactions to Fluosol-DA 20%. *Crit Care Med* 1984, 12:428-31

Vos, P. De, Haan, B.J. De, Wolters, G.H.J., Strubbe, J.H., Schilfgaarde, R. Van: Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of

alginate for microencapsulation of pancreatic islets. Diabetologia 1997, 40:262-270

Wada, S., Kajihara, H., Murakami, H., Sueda, T., Matsuura, Y.: Effects of perfluorochemical-based artificial blood compounds in discordant xenotransplantation. Artificial Organs 1995, 20(8):930-935

Wada, S., Kajihara, H., Murakami, H., Sueda, T., Matsuura, Y.: Xenotransplantation: Effects of FC 43 emulsion against hyperacute rejection in rodent discordant xenotransplantation. The Journal of Heart and Lung Transplantation 1995, 14(5):968-72

Wax, M.K., Briant, T.D.: Completion thyroidectomy in the management of Konkvität differentiated thyroid carcinoma. Otolaryng. Head and Neck Surg. 1992, 107: 63-71

Whitman, G.J., Roth, R.A., Kieval, R.S., Harken, A.H.: Evaluation of myocardial Preservation using ³¹P NMR. J Surg Res 1989, 38(2) : 154-161

Yao, C.Z., Ishizuka, J., Townsend, C.M., Thompson, J.C.: successful intracerebralventricular allotransplantation of parathyroid tissue in rats without immunosuppression. Transplantation 1993, 55:251

Zerkorn, T., Siebers, U., Bretzel, R.G., Heller, S., Meder, U., Ruttkay, H., Zimmermann, U., Federlin, K.: Impact of the Perfluorochemical FC 43 on Function of isolated islets: A Preliminary Report. Horm. Metab.Res. 1991, 23:302-303

Ziegler R.: Hypoparathyreodismus. In: Praktische Endokrinologie. Hrsg.: Jores, A., Nowakowski, H. Stuttgart, Thieme 1976, 122-131

Ziegler R.: Hypoparathyreoidismus. In: Innere Medizin (Duale Reihe); Hippokrates- Verlag im Thieme-Verlag; 1999, 841-844

Zimmermann, U., Klöck, G., Federlin, K., Hannig, K., Kowalski, M., Brezel, R.G., Horcher, A., Entenmann, H., Siebers, U., Zekorn, T.: Production of mitogen contamination free alginates with variable ratios of mannuronic to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* 1992, 13:269

Zimmermann, U., Miemitz, S., Zimmermann, H., Hillgärtner, M., Schneider, H., Ludwig, J., Hasse, C., Haase, A., Rothmund, M., Fuhr, G.: Hydrogel-Based Non-Autologous Cell and Tissue Therapy. *BioTechniques* 2000, 29: 564-581

ADRESSE

Julia Hanz
Jungferngasse 8
D-55576 Sprendlingen

Telefon: 06701 – 20 28 12
E-Mail: julia.hanz@gmx.de

Julia Hanz

Persönliche Information

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 20.1.1977
Geburtsort: Ludwigshafen/Rhein

Ausbildung

Schule

1983 – 1986	Grundschule Ludwigshafen/Pfingstweide
1986 – 1987	Grundschule Kirchhain
1987 – 1996	Gymnasium Philippinum Marburg
1996	Abitur, Latinum, Graecum

Studium

Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philippsuniversität
Marburg

1998	Physikum
1999	1. Staatsexamen
2002	2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

5/2002 – 8/2002	Chirurgie, Regionalsspital Siders-Leuk, Wallis
8/2002 – 12/2002	Wahlfach HNO, St. Josephs-Stift, Bremen
12/2002 – 4/2003	Innere Medizin, St. Josephs-Stift, Bremen

Famulaturen	4/1999	Innere Medizin, Parkklinik Weißensee, Berlin
	4/2000	Anästhesie, Klinikum Marburg
	Chirurgie, Zentralkrankenhaus Fuerteventura, Kanarische Inseln	
	9/2000	Chirurgie, Bordeaux, Frankreich
	2/2001	Innere Medizin, Praxis Dr. Küllmer, Kirchhain
Promotion	Seit 1999 Doktorandin in der Abteilung für Allgemeinchirurgie der Philippsuniversität Marburg;	
	1999 – 2001 praktische Laborarbeit	
	Thema der Arbeit: Allotransplantation von mikroenkapsuliertem humanem Nebenschilddrüsengewebe in Alginat	
Tätigkeiten neben dem Studium	Tutorin für „Problemorientiertes Lernen“ im Fach Physiologie für Studentengruppen im WS 97/98 und SS98	
	Tutorin im „Selbstuntersuchungskurs für Studenten“ im WS 98/99 und SS 99	
Berufserfahrung	Studentische Aushilfe im Pflegedienst des Überwachungszimmers der Klinik für Herzchirurgie der Philippsuniversität Marburg im Tag- und Nachtdienst von 1998-2002	
	ÄiP in der Medizinischen Klinik C, Klinikum Ludwigshafen seit 07/03	
	Assistenzärztin seit 10/04	
Sprachkenntnisse	Sehr gute Kenntnisse in Französisch	
	Gute Kenntnisse in Englisch und Spanisch	

Januar 2005_____

Folgende Damen und Herren waren meine Akademischen Lehrer:

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Beato, Bohrer, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Doss, Engel, Feuser, Friess, Fritz, Fruhsdorfer, Funk, Geller, Gemsa, Geus, Göke, Gotzen, Gressner, Grimm, Grzeschik, Gudermann, Habermehl, Happle, Hasilik, Hasse, Hebebrand, Hoffmann, Jungclas, Kalbfleisch, Kann, Kern, klenk, Klose, Koch, koehler, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennarz, Leonhardt, Leppek, Lill, Lippert, Martin, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Peter, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneider, Schüffel, Schulz, Seifart, Seitz, Seybert, Slenczka, Sommer, Steiniger, Sturm, Vohland, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Wulf

In Sierre:

Roz-Roland, Savioz, Spahr

In Bremen:

Franke, Gerste, Janka, Teyssen

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich herzlich bei allen ,die mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorgelegten Arbeit unterstützt haben.

Herrn Thomas Bohrer danke ich für die Einarbeitung, die gute Betreuung während meiner Laborarbeit und die gründliche Korrektur meiner Arbeit.

Ich danke allen MTA's im Labor der allgemeinchirurgischen Universitätsklinik Marburg, aber auch der anderen Labors die ich z.B. für die Durchführung der RIA und Anfertigung der Histos benutzen durfte für Ihre Geduld und Hilfestellung beim praktischen Teil meiner Arbeit.

Herrn Chr. Hasse möchte ich für die endgültige Korrektur und das Referat über meine Doktorarbeit danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre unermüdliche Korrektur und Motivationsarbeit, ohne die ich diese Arbeit nicht zum Abschluss gebracht hätte.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg eingereichte Arbeit mit dem Titel „Perfluorocarbon (FC 43), eine Option zur Verbesserung der Funktion von mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsentransplantaten“ aus dem Medizinischen Zentrum für operative Medizin, Klinik für Allgemeinchirurgie der Philippsuniversität Marburg unter der Leitung von Professor M. Rothmund mit Unterstützung von PD C. Hasse, Dr T. Bohrer und des gesamten Forscherteam ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.